

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



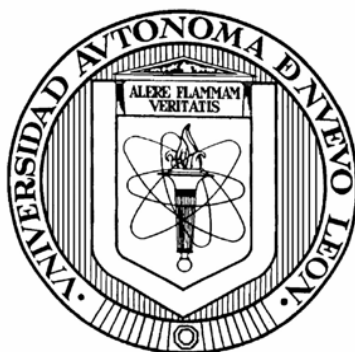
**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS
EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS DE AZUFRE EN
*Saccharomyces cerevisiae***

Por

CLARA SUSANA LEAL GUERRA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con acentuación en MICROBIOLOGÍA**

**Regulación de la expresión de genes involucrados en la producción de compuestos
de azufre en *Saccharomyces cerevisiae***



Comité de Tesis

Presidente
Dr. Benito Pereyra Alférez

Secretario
Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas

Vocal
Dr. José María Viader Salvadó

Asesor Externo
Dr. Luis Cástulo Damas Buenrostro

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a una etapa más en mi carrera profesional y poderla compartir con mis seres queridos, gracias por ser mi guía en todo momento.

A mi mama Ma. Concepción, papa Sr. Raúl Leal , hermano Raúl y abuelita Conchita por apoyarme en todo momento y por su infinito amor incondicional.

A Roberto por sus consejos, por apoyarme en todos mis proyectos y participar en ellos con amor.

Al Dr. Benito Pereyra por sus valiosos consejos y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Luis Damas por haber creído en mí para participar en este proyecto, por sus consejos y por su valiosa amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios (becario 285925).

A Cuauhtémoc Moctezuma Heineken de México por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A Esmeralda y Juan Manuel por apoyarme en todo momento y ser un excelente equipo, gracias por su valiosa amistad.

A Yenny y Eduardo por brindarme su apoyo en el momento en que lo necesite y sobre todo por su amistad.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra para la realización de este trabajo

DEDICATORIA

A Ma. Concepción Guerra,

Quien ha sido mi guía, mi compañera en todo momento, y la mejor amiga que Dios me pudo dar, gracias por ser mi mama.

TABLA DE CONTENIDOS

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	4
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
4.1 Objetivos Generales	
4.2 Objetivos Específicos	
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1 Generalidades de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
5.2 Fermentación.....	7
5.3 Ingredientes para la elaboración del mosto y sus propiedades.....	7
5.4 Requerimientos nutricionales para la levadura.....	8
5.5 Subproductos de excreción de la levadura durante el proceso de fermentación.....	10
5.6 Producción de compuestos de azufre en la fermentación.....	12
5.7 Formación de H ₂ S por el metabolismo y genética de la levadura.....	14
6. METODOS.....	18

6.1 Diseño Experimental.....	18
6.2 Cepas de levadura.....	18
6.3 Análisis de viabilidad de levadura.....	19
6.4 Mosto.....	19
6.5 Fermentaciones.....	20
6.6 Parámetros monitoreados durante la fermentación.....	21
6.6.1 Células en suspensión y diacetilo.....	21
6.6.2 Siembras microbiológicas.....	21
6.7 Análisis transcripcional global por medio de Microarreglos.....	21
6.8 Diseño de iniciadores.....	22
6.9 Verificación de iniciadores.....	23
6.9.1 Extracción de ADN total.....	23
6.9.2 Amplificación de fragmentos génicos por PCR.....	23
6.9.3 Verificación del tamaño de amplicones.....	24
6.9.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	24
6.10 Cuantificación de ADN y ARN.....	25
6.11 Fermentaciones para análisis de expresión por qPCR.....	25
6.11.1 Curvas estándar para tomar eficiencia máxima de iniciadores.....	25
6.11.2 Extracción de ARN Total.....	25
6.11.3 Obtención de ADNc.....	26
6.11.4 Medición de la expresión genética por qPCR.....	27
6.12 Análisis Estadísticos.....	28
6.12.1 Concentración de aminoácidos en mostos.....	28
6.12.1 Concentración de aminoácidos en mostos.....	28
6.12.2 Ensayos de cuantificación relativa.....	28

7. RESULTADOS.....	29
7.1 Fermentaciones para análisis de microarreglos.....	29
7.1.1 Análisis de Alfa amino nitrógeno libre en mosto.....	29
7.1.2 Análisis de expresión global por medio de microarreglos.....	29
7.2 Parámetros monitoreados durante la fermentación para microarreglos.....	32
7.2.1 Viabilidad celular.....	32
7.2.2 Diacetilo al final de la fermentación y análisis microbiológicas.....	32
7.3 PCR tiempo real.....	32
7.3.1 Diseño de iniciadores.....	32
7.3.2 Detección de amplicones de genes seleccionados.....	34
7.4 Fermentaciones para análisis de expresión por qPCR.....	35
7.4.1 Nutrientes del mosto.....	35
7.4.2 Análisis de expresión de los genes relacionados a la producción de compuestos de azufre.....	37
7.5 Parámetros monitoreados durante las fermentaciones de ensayos de qPCR.....	50
7.5.1 Viabilidad celular.....	50
7.5.2 Diacetilo al final de la fermentación y siembras microbiológicas.....	51
7.5.3 Células en suspensión.....	51
8. DISCUSIÓN.....	52
8.1 Análisis transcripcional por medio de microarreglos.....	52
8.2 Fermentaciones para análisis de PCR en tiempo real.....	53
8.2.1 Día 1 de fermentación.....	54
8.2.2 Día 2 de fermentación.....	57

8.2.3 Día 3 de fermentación.....	59
8.4 Resultados analíticos-sensoriales.....	61
8.5 Contraste de resultados de microarreglos y qPCR.....	63
8.6 Regulación genética de compuestos de azufre.....	64
9. CONCLUSIONES.....	66
10. FUTURAS INVESTIGACIONES.....	67
APENDICES.....	68
A. Vitalidad de la Levadura por Medio de Microcultivo	68
B. Amino Nitrógeno Libre (FAN) en el Mosto	69
C. Aminoácidos Libres	71
D. Análisis de Carbohidratos	73
E. Medición de Diacetilo	75
F. Extracción de ARN para análisis de microarreglos por el método establecido por Schmith y colaboradores (1992).	76
G. Elaboración de Microarreglos	77
H. Curvas de disociación de los amplicones	81
LITERATURA CITADA	86
RESUMEN BIBLIOGRAFICO	93
ARTICULO	94

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Clasificación de aminoácidos en el mosto según Jones y Pierce (1964)	10
II Genes que participan en la ruta de asimilación de sulfato, reducción a sulfito y sulfuro y su incorporación en aminoácidos	16
III Diseño de fermentaciones para análisis de microarreglos	18
IV Formulación de mostos experimentales para ensayos de microarreglos y qPCR	19
V Diseño de microarreglos	22
VI Mezcla de reacción para amplificación de genes	24
VII Condiciones del termociclador para la detección de genes.	24
VIII Diseño de fermentaciones para análisis de expresión génica.	25
IX Mezcla de reacción para la obtención de ADNc a partir de ARN total mediante PCR reversa.	26
X Condiciones del termociclador para la obtención de ADNc a partir de ARN total.	27
XI Mezcla de reacción para análisis de expresión genética.	27
XII FAN en mostos para ensayos de microarreglos	29
XIII Efecto en genes relacionados a la generación de compuestos de azufre.	30
XIV Porcentaje de células viables, en la levadura de inóculo y en cosecha.	32
XV Iniciadores utilizados para análisis de qPCR	33
XVI Resultados analíticos de nutrientes de los mostos para ensayos de qPCR	35
XVII Perfil de aminoácidos de mostos para análisis de qPCR.	36
XVIII Cambios significativos de expresión a nivel de cepas y mostos en el día 1, 2 y 3 de fermentación.	40
XIX Porcentaje de células viables, en la levadura de inóculo y en cosecha.	51
XX Células en suspensión al final de la fermentación representada en millones de	51

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ruta de asimilación de sulfato, reducción a sulfito y sulfuro y su incorporación en aminoácidos (Adaptado de Thomas y Surdin-Kerjan, 1997; Yoshida <i>et al.</i> , 2008).	15
2	Fermentaciones en probetas de 2 L.	20
3	Ubicación de genes seleccionados por microarreglos, en la ruta metabólica de asimilación de sulfatos reducción de sulfito y sulfuro y la incorporación de aminoácidos azufrados.	31
4	Productos de PCR tiempo real de genes seleccionados en la cepa 820 y 790.	34
5	Porcentaje de aminoácidos con respecto al total de cada mosto. El signo de “*” indica diferencias significativas entre los mostos según la prueba de Benjamini-Hochberg.	36
6	Graficas de valor $\Delta C_p'$ de cada gen, al día 1 (F1D), día 2 (F2D) y día 3 (F3D) de fermentación, en Mosto 1 y Mosto 2 en la cepa 790 y 820, representando con un “*” donde hubo efecto significativo ($p < 0.05$) de “C”, cepa, “M”, mosto, “I”, interacción cepa-mosto.	39
7	Genes con diferencia significativa ($p < 0.05$) en su expresión debido a cepa, mosto e interacción cepa-mosto al día 1 de fermentación	41
8	Grafica del valor $\Delta \Delta C_p'$ al día 1 de fermentación	42
9	Graficas de interacción cepa-mosto, día 1 de fermentación. A) MET28, B) MET4, C) CYS4, D) HOM6	43
10	Genes con diferencias significativas ($p < 0.05$) de cepa, mosto e interacción cepa-mosto al día 2 de fermentación	44
11	Grafica del valor $\Delta \Delta C_p'$ al día 2 de fermentación	45
12	Graficas de interacción cepa-mosto, día 2 de fermentación. a) MET31, b) SER2, c) CYS4, d) MHT1	46
13	Genes con diferencias significativas ($p < 0.05$) de cepa, mosto e interacción cepa-mosto al día 3 de fermentación	47
14	Grafica del valor $\Delta \Delta C_p'$ al día 3 de fermentación	48

15	Graficas de interacción cepa-mosto, día 3 de fermentación. a) CYS4, b) MET31, c) MET32, d) MET28, e) CBF1	50
16	Concentraciones de H ₂ S (A) y MetSAc (B) al Final de fermentación (FF) y tercer día de reposo (R3D) para ambas cepas, M1 18H (mosto 1 viabilidad 18°C-18H), M2 18H (mosto 2 viabilidad 18°C-18H). Diferencias significativas con $p < 0.05$ (*): “C” cepa, “M” mosto e “I” interacción cepa-mosto (Pérez, 2010)	62
17	Habilidad de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos en FF (A) y R3D (B). (Pérez, 2010)	63
18	Modelo de regulación de la síntesis de compuestos azufrados en la cepa 790 y 820 y su interacción con el mosto	64

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ado Met	S-adenosilmetionina
cel/ml	Células por mililitro
°C	Grados Celsius
Conc.	Concentración
CVA	Compuestos volátiles de azufre
Cp	Punto de cruce (ing. Crossing point)
Cp'	Punto de cruce corregido en base a eficiencia
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DMS	Dimetil sulfuro
FAN	Alfa amino nitrógeno
H₂S	Acido sulfhídrico
PPM	Partes por millón
PPB	Partes por billón
°P	Grado plato
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SO₂	Dioxido de azufre
Trub	Solidos del mosto
ΔCp	Delta punto de cruce (ing. crossing point)
ΔCp'	Delta punto de cruce corregido en base a eficiencia
ΔΔ Cp'	Delta delta punto de cruce corregido en base a eficiencia

RESUMEN

El proceso de producción de cerveza es considerado un arte, donde intervienen dos factores primordiales: la levadura y el mosto. Es conocido que la levadura producirá etanol pero, dependiendo del tipo de ingredientes del mosto, también puede sintetizar ciertos metabolitos que alteran las características de la cerveza. Entre éstos se encuentran compuestos volátiles de azufre (CVA), tal es el caso de H_2S , tioles, tioesteres y dióxido de azufre. El H_2S se genera por la actividad de ciertos genes involucrados en el metabolismo de asimilación de sulfatos, sulfitos ó bien síntesis de aminoácidos azufrados. Los CVA son de alto impacto negativo ya que, pequeñas trazas de éstos, pueden generar aromas indeseables en la cerveza. Aunque se han realizado avances en el conocimiento de la interacción de ciertos genes para la producción de compuestos de azufre, se desconocen los niveles de expresión y las interacciones en los mismos bajo las distintas condiciones de fermentación industrial. En el presente estudio identificamos los genes que participan en la producción de los CVA y su respuesta bajo distintas condiciones de proceso. Usamos las cepas tipo Lager 820 y 790, las cuales fueron sometidas a fermentación de dos tipos de mosto: 1) baja concentración de nitrógeno y 2) control. La respuesta de la expresión genética fue evaluada con microarreglos de ADN y cuantificada con qPCR. En el mosto (1), la cepa 820 mostró baja expresión de los genes MET6, MET13 y MHT1, los cuales favorecen a la incorporación de sulfuro a esqueletos carbonados, pero sobre expresó MET3 y MET2, implicados en la entrada de sulfato a la célula, generando sulfuro. Por su parte, la cepa 790 tuvo una regulación genética totalmente distinta ya que, solo sobre expresó el gen MHT1, relacionado con la vía de equilibrio en la producción de AdoMet/metionina. Estos resultados fueron confirmados usando qPCR, analizando la expresión de 18 genes en total. La cepa 820 en presencia de mosto bajo en compuestos nitrogenados (mosto a) no fue capaz de ajustar su maquinaria genética para la incorporación del sulfuro a esqueletos carbonados, mientras que en presencia de mostos ricos en compuestos nitrogenados (mosto 2) reguló su maquinaria genética, expresando el gen CYS4 involucrado en la vía de transulfuración, favorecido por la incorporación de serina en la ruta. La cepa 790 tuvo un comportamiento diferente, fue capaz de ajustar su maquinaria genética en presencia de mostos tipo (1) activando genes por la vía de transulfuración (CYS4, SER2) así como también genes por la vía de incorporación del sulfuro para producción de metionina y remetilación de S-adenosilmetionina (MET6, MET13, MHT1). De esta forma se demostró que la producción de compuestos azufrados depende de la constitución genética de la cepa y su interacción con el mosto.

ABSTRACT

The brewing process is considered an art, which involved two primary factors: yeast and wort composition. It is known that depending on the composition and wort raw materials nature, yeast will carry out the production of alcohol, but also certain compounds that can alter the characteristics of the product. Among these ones volatile sulfur compounds (VSC), as is the case of H_2S , thiols, thioesters and sulfur dioxide play an important negative role. The H_2S is generated by the activity of certain genes involved in the metabolism of sulfate assimilation, sulfites or sulfur amino acid synthesis. These compounds are considered as high impact ones, because small amount of them produce undesirable aromas in beer. Even though there has been some advances in the knowledge of the interaction of certain genes to produce sulfur compounds, it is still unknown the expression levels and gene interactions under the different conditions of industrial fermentation. In order to know the influence of wort, we used two strains Lager type, 790 and 820 strains and two condition of wort: (1) lower nitrogen condition and (2) control. In the present study we analyzed genes involve in the production of sulfur compounds and their response under different process conditions using DNA microarray analysis. In the presence of worts with low level of nutrients nitrogen, strain 820 downregulated genes that favor the incorporation of sulfur to carbon skeletons (MET6, MET13, MHT1) and at the same time over expressed genes related to the input of sulfate into the cell generating sulfur (MET3, MET2) in the other hand, strain 790 upregulated the way of balance in the production of AdoMet / methionine (MHT1 gene), without having an effect in any other gene involved. These results were confirmed by using qPCR, analyzing 18 genes total. 820 under the presence of low nitrogen compounds (wort1) was not able to adjust their genetic machinery for the incorporation of sulfur to carbon skeletons, in the other hand under the presence of wort rich in nitrogen compounds (wort 2) regulated its genetic machinery, expressing more genes involved in the transsulfuration pathway (CYS4) favored by the incorporation of serine in the way. 790 behaved differently, was able to adjust their genetic machinery in the presence of low content of nitrogen compounds by activating genes via transsulfuration (CYS4, SER2) as well genes by the incorporation of sulfur for methionine production and S-adenosylmethionine remethylation (MET6, MET13, MHT1). By this way showed that production of sulfur compounds depends on the genetic constitution of the strain and its interaction with the wort.

1.0 INTRODUCCIÓN

En la elaboración de cerveza, el mosto es el líquido que provee los nutrientes que son asimilados por la levadura durante la fermentación, generando subproductos del metabolismo de la misma, como son los compuestos volátiles de azufre (CVA), entre los que destacan sulfuro de hidrógeno (H_2S), dióxido de azufre (SO_2) y el dimetil sulfuro (DMS). Estos tienen un efecto en la calidad sensorial en la cerveza y son uno de los parámetros más difíciles de controlar, ya que la composición y concentración de estos varía en función de los componentes del mosto, condiciones de manejo de la levadura y tipo de cepa así como variables de fermentación (Duan *et al.* 2004; Hardwick, 1995).

La formación de H_2S está relacionada con el metabolismo de la levadura, el ion HS^- es un intermediario metabólico necesario en la reducción de sulfato o sulfitos, para la biosíntesis de compuestos orgánicos azufrados como metionina, cisteína o S-adenosil-metionina así como tripéptidos como el tiol glutatión, los cuales son requeridos para la síntesis de proteínas. La concentración de algunos de estos aminoácidos influyen la formación de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y dióxido de azufre (SO_2) durante la fermentación (Duan *et al.*, 2004; Hardwick, 1995; Heggart *et al.*, 1999).

Algunas prácticas cerveceras pueden favorecer la producción de CVA, como es el caso de la maceración de la malta, nutrición de la levadura; altas temperaturas de fermentación, autólisis de levadura en el medio; pobre eliminación del gas dióxido de carbono, entre otros (Hardwick, 1995). Debido a su contribución aromática, la formación de estos compuestos en bebidas fermentadas ha sido sujeto de interés ya que pueden jugar un rol atractivo o repulsivo dependiendo de su identidad y concentración (Laundaud *et al.*, 2008).

La levadura requiere de la activación de ciertos genes que codifican las enzimas necesarias para la incorporación del ion HS^- a distintas vías, tal es el caso de los genes relacionados a la asimilación de sulfatos (*MET3*, *MET14*, *MET16*), asimilación de sulfitos (*MET5*, *MET10*, *MET25*, *MET2*, *STR4*, *STR1*), o bien síntesis de algunos aminoácidos azufrados (*MET6*, *MET13*, *SAM1*, *SAM2*) (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Se ha demostrado la evidencia de que el tipo de cepa de levadura, y por consiguiente su carga genética, es una variable importante en la producción de H_2S ya que pueden

responder de diferente forma bajo ciertas condiciones de factores medioambientales y fisiológicos (Linderholm *et al.*, 2008).

Por consiguiente, existe la necesidad de tener un mayor conocimiento sobre la expresión de genes relacionados a compuestos de azufre bajo condiciones variadas de operación. Más aun la caracterización de los niveles de expresión de estos genes ayudaría en gran medida a optimizar el proceso cervecero.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Uno de los parámetros críticos para la industria cervecera es la generación de compuestos volátiles de azufre como es el caso de H₂S por el metabolismo de la levadura, ya que dan por resultado olores desagradables. Se requieren ligeras cantidades en el orden de ppb para que puedan ser percibidos.

Las variaciones que se puedan tener en nutrientes del mosto, almacenamiento de la levadura, tipo de cepa, temperatura de fermentación, entre otras variables, pueden favorecer a la formación de estos compuestos. Sin embargo se desconocen los mecanismos de respuesta genética a nivel transcripcional de *S. cerevisiae* bajo estos factores. Identificar los genes involucrados en esta respuesta, ayudará a monitorear el comportamiento de la cepa, lo que permitirá optimizar los procesos de fermentación.

3. HIPOTESIS

Variaciones en nutrientes del mosto y tipo de cepa en condiciones de fermentación afectan la expresión de genes involucrados en la producción de compuestos de azufre.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de nutrientes del mosto (contenido de malta), condiciones de almacenamiento de levadura y tipo de cepa a nivel de expresión de genes involucrados en la generación de compuestos volátiles de azufre en cerveza tipo lager de *S. cerevisiae*.

4.2 Objetivos específicos

1. Realizar dos condiciones de fermentación a escala laboratorio variando el contenido de malta en el mosto así como el tiempo y temperatura de almacenamiento de dos cepas (820 y 790).
2. Realizar un análisis transcripcional global por medio de Microarreglos y seleccionar genes de impacto en relación a compuestos de azufre bajo estas dos condiciones de fermentación anteriormente mencionadas.
3. Diseñar oligonucleótidos de genes seleccionados y realizar análisis de PCR para su detección.
4. Analizar a nivel de transcripción de los genes seleccionados mediante qPCR de las cepas 820 y 790 bajo fermentaciones variando el contenido de malta y manteniendo un tiempo y temperatura de almacenamiento.

5.0 ANTECEDENTES

5.1 Generalidades de *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras se consideran organismos facultativos anaeróbicos, esto es que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno, y son responsables de convertir los azúcares fermentables en alcohol y otros subproductos (Goldammer, 2008).

Las levaduras se encuentran dentro de la clase Ascomycetes, orden Endomycetales, familia Saccharomycetaceae, subfamilia Saccharomycoideae y género *Saccharomyces*. Una forma de reducir el número de especies fue clasificar a *Saccharomyces uvarum* perteneciente a levaduras de fermentación baja (lager) y *Saccharomyces cerevisiae* como levaduras de fermentación baja (ale), de destilería y panaderas, en una sola especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para poderlas distinguir es por la habilidad de fermentar melibiosa, *S. uvarum* si la puede fermentar, mientras que *S. cerevisiae* no. Esto se debe a que la primera posee el gen *MEL* que codifica para la enzima α -galactosidasa (Priest y Cambell, 1987; Russell, 1995).

S. cerevisiae es un microorganismo eucariota, unicelular, mide entre 8 – 14 μm aproximadamente. Su estructura está conformada de pared celular, núcleo, vacuolas, retículo endoplásmico, citoplasma, mitocondrias y membrana plasmática. Su replicación es por gemación multilateral y tiene un promedio de vida replicativo finito, esto es, cada célula individual es solamente capaz de un número limitado de divisiones (aproximadamente 30) antes del inicio de su vejez, y finalmente su muerte (Hough *et al.*, 1982; Barker y Smart, 1996). El ciclo de vida asexual de una célula de levadura se le denomina reproducción vegetativa ó gemación y se refiere a una serie de eventos que ocurren entre la formación de una célula por división de una célula madre y el momento en el que esa célula hija se divide.

La mayoría de las levaduras cerveceras son diploides, poliploides, o aneuploides, este tipo de cepas tienden a tener un comportamiento estable en cuanto a mutaciones genéticas ya que poseen copias múltiples de genes requeridos para llevar a cabo funciones específicas. Por el contrario, las mayoría de las cepas de laboratorio son haploides, en donde si se llega a perder un gen a consecuencia de una mutación, la

función del mismo puede perderse si no hay un gen alternativo o de “repuesto” (Klimovitz, 2002; Russell, 1995).

En la elaboración de cerveza, es de suma importancia tener conocimiento de la cepa en base a su composición genética, estructura, metabolismo, desempeño en la fermentación, entre otros parámetros, ya que existen diferencias marcadas entre cepas de la misma especie, lo que genera perfiles diferentes de sabor y aroma en la cerveza (Kunze, 1999).

5.2 Fermentación

Es uno de los procesos más importantes dentro de la elaboración de cerveza. Es el paso en el cual los carbohidratos fermentables son convertidos por la levadura en etanol y otros productos, y en el cual, se producirán los diversos componentes del sabor de la cerveza que se desarrollan a través de interacciones con otros componentes del mosto. La levadura excreta estos subproductos al consumir los distintos componentes del mosto, como es el caso de los compuestos nitrogenados, los cuales utiliza para la síntesis de nuevas estructuras celulares y proteínas (Meilgaard, 1999).

5.3 Ingredientes para la elaboración del mosto y sus propiedades

Para la elaboración de cerveza se requieren diversos ingredientes que le darán sus características fisicoquímicas. En el caso del mosto, el cual es el líquido donde se inocula la levadura para la fermentación, se elabora de lo siguiente:

Malta: Es derivado de la cebada malteada la cual, es una fuente de extracto fermentable y proporciona características de aroma, sabor y color a la cerveza. Para obtener la malta, ésta pasa a través de un proceso de remojo, germinación y secado, en donde por medio de ciertas enzimas se rompe la pared del endospermo, quedando proteínas solubles en agua y por último se inicia la degradación de gránulos de almidón en azúcares fermentables, y otros productos (Kendall, 1995).

Adjuntos: Son fuente de azúcares para el mosto, y que contribuyen en la carga de azúcares para el mosto”. Los cereales que se utilizan comúnmente como adjuntos son el maíz y arroz, estos son ricos en almidón; sin embargo, una amplia gama de otros cereales, tales como, trigo, o sorgo, también se han empleado. Se ha observado que a

diferencia de la malta, no contribuyen típicamente en ninguna actividad enzimática y tienen poco ó nada de nitrógeno soluble. Los adjuntos, aunque no son esenciales en la elaboración de cerveza, se utilizan en la mayoría de países de acuerdo a los propósitos de reducir costos (Stewart, 1995; Glatthar *et al.*, 2002).

Lúpulo: El cual contribuye al aroma de la cerveza, proviene de la planta *Humulus lupulus*. Tiene diversos beneficios en la cerveza como es la estabilidad en la espuma, la claridad en la cerveza, mejora la estabilidad de sabor por medio de la actividad bacteriostática de sus ácidos iso-alfa provenientes de sus resinas (Grant, 1995).

Agua: Contribuye aproximadamente el 96% del volumen total de la cerveza, aportando minerales, los cuales se controlan por medio de desmineralización y por ajuste de sales para alcanzar los parámetros requeridos (Moll, 1995).

Estos ingredientes se introducen en orden al área de cocimientos, en donde bajo ciertas temperaturas, actúan enzimas amilasas que hidrolizan el almidón y lo transforman en azúcares fermentables provenientes tanto de la malta como de los adjuntos. Posteriormente se elimina toda cascarilla y se lleva a ebullición en donde es introducido el lúpulo. Una vez realizado este paso, se transfiere el mosto a un recipiente para favorecer el asentamiento de sólidos (llamado “trub”). Después se lleva a través de chaquetas de enfriamiento hasta dejarlo a una temperatura adecuada para la inoculación de levadura.

5.4 Requerimientos nutricionales para la levadura.

Cuando la levadura es inoculada en el mosto, entra a un ambiente extremadamente complejo. Este contiene azúcares, dextrinas, vitaminas, sales, iones y minerales, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, solo por mencionar algunos. Investigaciones han demostrado que la levadura utiliza de manera ordenada la amplia variedad de nutrientes en el mosto.

Oxígeno: Cuando la levadura se inocula en el mosto, es necesario contar con cierta cantidad de oxígeno, ya que este promueve que la levadura sintetice ácidos grasos y esteroides para producir los componentes de la membrana necesarios para su crecimiento adecuado durante la fermentación. La concentración de este debe de estar optimizada ya que una inadecuada aireación puede generar limitaciones en el

crecimiento, problemas de sabor en la cerveza y un bajo rendimiento en la fermentación. Es por ello que se sugiere introducir 1 ppm por cada °P (es igual a 1 g de extracto en 100 g de mosto) generado en el mosto (Duan *et al.*, 2004; Hardwick, 1995).

Absorción y metabolismo de carbohidratos en el mosto

Los azúcares fermentables, son consumidos por la levadura en el orden siguiente: sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y maltotriosa. Estos dos últimos son los más complejos y abundantes en el mosto, por lo que la levadura cervecera posee permeasas de maltosa y maltotriosa que transportan este azúcar dentro de la célula; ya una vez dentro, el azúcar es hidrolizado a glucosa por medio de la enzima α glucosidasa (Zheng *et al.*, 1994).

Absorción y metabolismo del nitrógeno en el mosto.

Para activar el crecimiento celular, se requiere de la absorción de α -amino-nitrógeno (FAN), principalmente en forma de aminoácidos, los cuales se utilizan para la síntesis de proteínas y otros componentes nitrogenados en las células, de igual forma estos se utilizan para la regeneración de NAD^+ por la vía de Ehrlich (Lewis y Young, 1995). Como ya se mencionó, en el mosto la fuente principal de nitrógeno para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes nitrogenados, es la variedad de aminoácidos provenientes de la proteólisis de la cebada, en donde dependiendo de la preparación del mosto, los niveles de FAN varían entre 100 a 250 mg/L (Heggart *et al.* 1999). El mosto como tal, contiene aproximadamente 19 aminoácidos. La levadura en condiciones de fermentación los consume de manera ordenada, tal como se presenta en la tabla I. En 1964, Jones y Pierce clasificaron los aminoácidos en 4 grupos en base a la velocidad de asimilación por la levadura. Al inicio de la fermentación los 8 aminoácidos clasificados en el grupo “A” son absorbidos de manera inmediata durante el crecimiento celular, los del grupo “B” son removidos más lentamente, mientras que los del grupo “C” se absorben una vez que se hayan consumido los aminoácidos del grupo “A” y “B”. Este orden de absorción se cree que se debe a determinadas clases de permeasas de aminoácidos, una generalmente específica para el grupo A y C, y una específica para el grupo B. Por último el grupo “D” se encuentra el aminoácido prolina, aunque es el más

abundante en el mosto, bajo las condiciones de fermentación la levadura no tiene la incapacidad de asimilarlo. Mientras que otros aminoácidos estén presentes en el mosto, la actividad de la enzima permeasa de prolina, la cual cataliza el transporte de prolina a través de la membrana celular, se reprime por lo cual no es absorbida. La explicación a esto es que una vez dentro de la célula, la primera reacción catabólica de la prolina implica la acción de prolina oxidasa que requiere la participación del citocromo C y oxígeno molecular. Una vez que los demás aminoácidos se han asimilado, hay una remoción de la represión de la permeasa de prolina, pero en las condiciones de fermentación que son extremadamente anaeróbicas, se inhibe la actividad de la enzima prolina oxidasa y por ello la captación de este aminoácido no ocurre (Hardwick, 1995; Lekkas *et al.*, 2005).

Tabla I. Clasificación de aminoácidos en el mosto^a

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Absorción rápida	Absorción mediana	Absorción baja	Absorción escasa o nula
Acido glutámico	Valina	Glicina	Prolina
Acido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Isoleucina	Triptofano	
Serina	Histidina	Alanina	
Treonina		Amonio	
Lisina			
Arginina			

^a según Jones y Pierce (1964) (citado por Lekkas *et al.*, 2007)

5.5 Subproductos de excreción de la levadura durante el proceso de fermentación.

Uno de los mayores productos de excreción producido durante la fermentación del mosto por la levadura es el etanol, sin embargo este alcohol primario tiene un pequeño impacto en el sabor de la cerveza terminada. Es el tipo y concentración de una amplia variedad de otros subproductos de excreción de la levadura durante la fermentación, los que determinaran el sabor de esta bebida. Tal es el caso de los compuestos volátiles, los cuales dependen en gran medida de la cepa de levadura

empleada, las materias primas, procesos de maceración, fermentación, entre otros. Las siguientes sustancias se han encontrado en la cerveza:

Alcoholes: En adición al etanol, están presentes otros alcoholes tales como los alcoholes superiores o de fusel y constituyen una parte importante de los subproductos formados durante la fermentación del mosto. Su formación está ligada a la síntesis de proteínas y se forman a partir de β ácidos, que a su vez pueden ser formados por la transaminación y desaminación de aminoácidos, ó sintetizados a partir de carbohidratos del mosto. La fermentación de estos alcoholes de fusel depende en gran medida de la temperatura de fermentación, ya que un incremento en la temperatura provoca su aumento en la cerveza terminada (Russell, 1995).

Esteres: Son los responsables del carácter frutal de bebidas fermentadas; los esteres volátiles constituyen un grupo importante de compuestos aromáticos en la cerveza (como es el acetato de etilo y acetato de isoamilo) (Heggart et al., 1999). Se pueden clasificar en dos tipos: esteres de acetato y esteres de ácidos grasos de cadena media. Los esteres se forman de manera general, por la condensación de un alcohol y un ácido orgánico. Para los esteres de acetato, el acetato (acetil CoA) es el residuo del ácido y el etanol o alcoholes superiores sirven como la parte estructural del alcohol. Por otro lado los esteres de ácidos grasos de cadena media se componen de una cadena media de ácidos grasos así como también de etanol o alcoholes superiores. Una cantidad significativa de esteres se forman cuando la levadura declina su crecimiento. La síntesis de esteres es un proceso intracelular y es catalizado por enzimas como la alcohol acetiltransferasa. Su formación durante la fermentación depende de la actividad enzimática y de la disponibilidad de acetil CoA. Otro factor que juega un rol importante en su formación es la temperatura, ya que a temperaturas elevadas incrementa su síntesis (Eßlinger, 2009).

Compuestos carbonilos: Uno de los carbonilos encontrados en altas concentraciones en cerveza es el acetaldehído. Este se forma durante la fermentación en un punto de ramificación metabólica de la vía que conduce los carbohidratos a etanol. Los carbonilos tienen una importancia en la estabilidad del sabor de la cerveza ya que un exceso de estos compuestos pueden generar un sabor añejo en el producto terminado (Russell, 1995).

Diacetilo y 2,3- pentanodiona: Estos dos compuestos son llamados dicetonas vicinales. Ambos generan un sabor a mantequilla en la cerveza. El precursor para la formación de diacetilo es el α -acetolactato proveniente de la vía de piruvato, para la formación de los aminoácidos valina y leucina necesarios para la síntesis de proteínas. Este precursor es transportado fuera de la célula donde es convertido de manera no enzimática en diacetilo. Este compuesto puede ser reasimilado por la célula y ser reducido enzimáticamente por la vía de acetoina en butanediol (Munroe, 1995 a).

Compuestos sulfurados: El azufre es importante en el proceso cervecero, ya que trazas de compuestos volátiles de azufre como el ácido sulfhídrico, dimetil sulfuro, dióxido de azufre, y tioles contribuyen significativamente en el sabor y olor de la cerveza (Russell, 1995). A continuación se detallarán estos compuestos con el fin de introducir el objetivo de estudio del presente trabajo.

5.6 Producción de compuestos de azufre en la fermentación.

Unos de los productos de excreción de la levadura que derivan del metabolismo y que impactan en el sabor de la cerveza son los compuestos volátiles de azufre. Estos compuestos son de suma importancia ya que pequeñas trazas que pasen sobre los límites de umbral sensorial aceptables para las cervezas tipo lager pueden ser inaceptables en el producto final. La levadura requiere de estos compuestos azufrados para la síntesis de proteínas, en donde una de las fuentes de azufre en el mosto son iones de sulfato provenientes del agua, tioles y sulfuros de materias primas, particularmente aminoácidos azufrados (Knudsen, 1984; Munroe, 1995 b).

Los compuestos azufrados más importantes provenientes del metabolismo de la levadura son los siguientes:

Sulfuros como el Dimetil Sulfuro (DMS): Se forma a través de dos vías: durante la fermentación por la acción de la levadura sobre el dimetil sulfóxido que se produce en la olla de cocimiento, y también por la hidrólisis de la malta por medio de la conversión de S-metilmetionina (SMM) durante el macerado (Munroe, 2006). Este subproducto es de importancia para el aroma y el sabor de la cerveza. Los niveles del DMS en cerveza lager exceden regularmente el nivel del umbral de olor de 30 ppb. Arriba de este límite de umbral pero por debajo de 100 ppb aproximadamente, el DMS

contribuye al gusto distintivo de algunas cervezas tipo lagers. Cuando está presente en cantidades mayores a 100 ppb, puede impartir un sabor generalmente indeseable descrito como “maíz dulce” (Laundaud *et al.*, 2008)

Tioles: Vermeulen y cols (2006), reportaron la presencia de más de diez tioles polifuncionales en cerveza fresca tipo lager, todos ellos ausentes en el mosto, lo cual sugiere el papel clave en la excreción de H₂S por la levadura durante la fermentación. Se ha relacionado a cisteína y metionina, provenientes del mosto, en la formación de estos compuestos. Los tioles tienen un umbral de detección de 0.5 – 3.0 ppb.

Tioesteres: Uno de los tioesteres encontrados en cerveza es el S-metiltioacetato (S-MTA), se cree que su formación se da por una enzima que cataliza la reacción entre metanotiol y Acetil CoA. Su umbral de detección esta en 50 ppb aproximadamente (Laundaud *et al.*, 2008; Miracle *et al.*, 2005)

Dióxido de azufre (SO₂): Este compuesto está presente en la cerveza en concentraciones por debajo de 10 partes por millón (ppm), en estos niveles no tiene un impacto en el sabor. Es producido durante el proceso de fermentación como un subproducto en la síntesis de aminoácidos en el metabolismo de sulfatos del medio (Laundaud *et al.*, 2008; Munroe, 2006). Pickerell y colaboradores (1991), mencionaron que el manejo de la levadura como el tiempo de cosecha, lavado, así como temperatura de almacenamiento, afectan la viabilidad de la levadura, resultando concentraciones altas de dióxido de azufre al final de la fermentación.

Las adiciones de bisulfito SO₂, así como SO₂ libre, actúan como trampas de radicales libres, retrasando la oxidación de la cerveza (Duan *et al.*, 2004).

Acido sulfhídrico (H₂S): H₂S tiene un aroma a huevo podrido y la eliminación de este compuesto puede ser auxiliada por la acción del CO₂. Trazas (en partes por billón (ppb)) son aceptables en cervezas tipo lager para este compuesto, ya que tiene un bajo umbral de detección (5-10 ppb); pero puede darse el caso de cervezas que presenten valores arriba de 20 ppb. Se ha observado que numerosos parámetros afectan el contenido de H₂S en la cerveza como: cepa de levadura, concentración de oxígeno en el mosto, contenido de trub, y absorción de oxígeno durante el traslado de la cerveza verde a los tanques de almacenamiento así como contaminaciones con bacterias gram negativas (Laundaud *et al.*, 2008; Munroe, 2006; Heggart *et al.*, 1999).

5.7 Formación de H₂S por el metabolismo y genética de la levadura.

El H₂S es un producto del transporte de iones sulfuro por la levadura durante el metabolismo de iones sulfato y compuestos orgánicos azufrados. En la figura 1 se muestra la formación de sulfito y sulfuro y su relación con el metabolismo de la levadura gracias a la participación de ciertos genes que codifican las enzimas necesarias para llevar a cabo el proceso (tabla II). Como se puede observar en la ruta, el ion HS⁻ es un intermediario metabólico en la reducción de sulfato o sulfitos, necesario para la síntesis de compuestos orgánicos azufrados.

La producción de H₂S depende del tipo de cepa, los niveles de aminoácidos azufrados como metionina, cisteína, S-adenosil-metionina, al igual de aminoácidos no azufrados como serina y treonina y la concentración de nitrógeno amino libre (FAN) en el medio (Duan *et al.*, 2004).

Laundaud y colaboradores (2008) mencionan que cuando existe suficiente nitrógeno en el mosto, los precursores de la metionina y cisteína (O-acetil serina y O-acetil homoserina) requerirán del ion HS⁻, pero si el nitrógeno es limitado, no habrá suficientes precursores disponibles y el H₂S se acumulará en la célula difundiéndose posteriormente al medio. Esto puede pasar en mostos que contienen una mayor cantidad de adjuntos y una menor cantidad de malta (Meilgaard, 1976).

Existen genes que codifican para las distintas enzimas que guíen la vía para el metabolismo de azufre (llamados *MET*), los cuales se pueden ver afectados bajo ciertas condiciones de proceso. Para la activación de estos genes se requiere 5 factores a nivel de transcripción: Cbf1p, Met4p, Met28p, Met31p, Met32p, estos forman un complejo heteromérico en la región “upstream” de los genes de azufre. Met4p es un activador transcripcional, cuya actividad está regulada por la producción de S-Adenosilmetionina (Ado Met). Se ha observado que cuando hay concentraciones altas de Ado-Met intracelular, baja la actividad de Met4p, evitando un acumulo de este en la célula (Thomas, *et al.*, 1997).

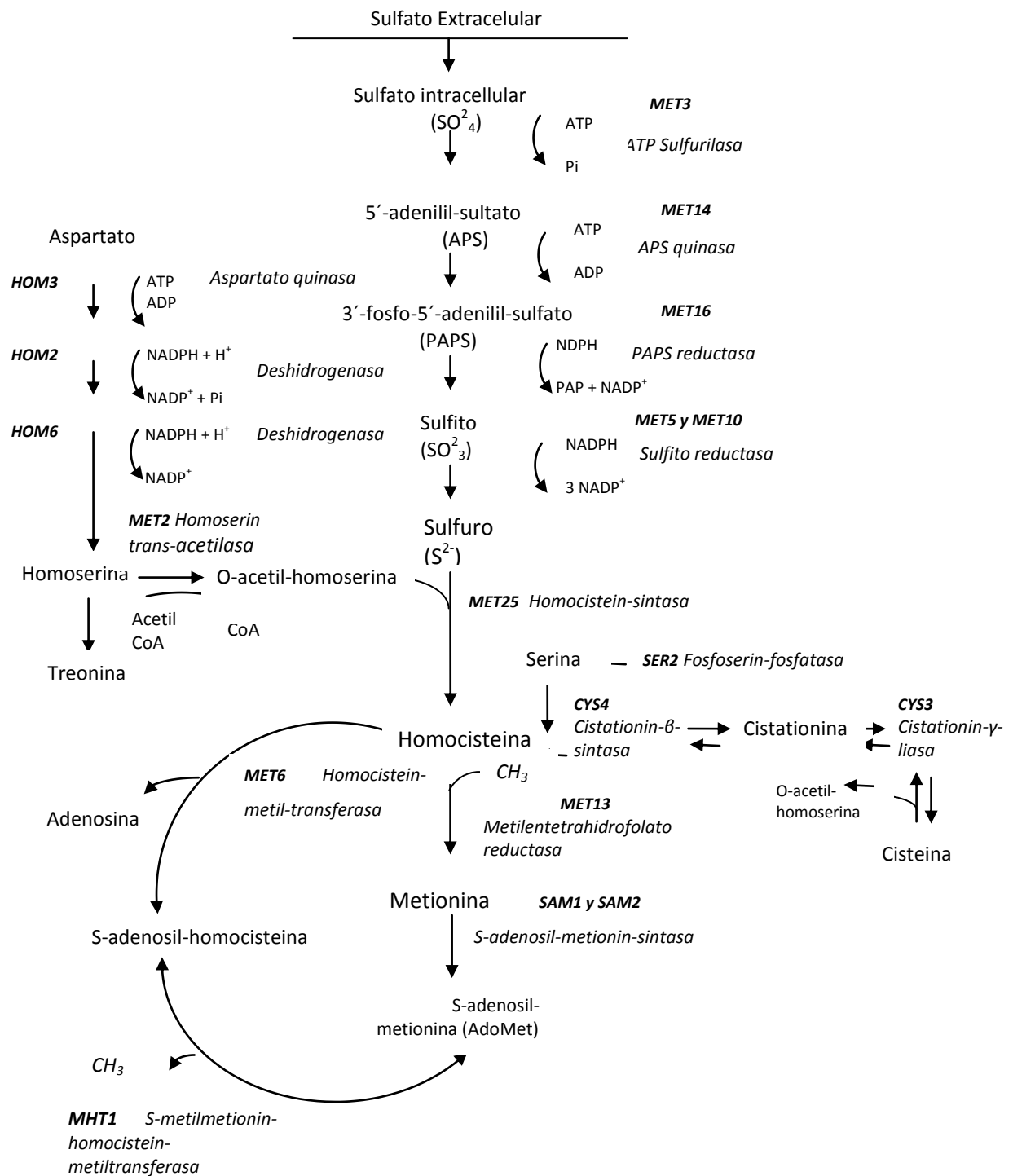


Figura 1: Ruta de asimilación de sulfato, reducción a sulfito y sulfuro y su incorporación en aminoácidos (Adaptado de Thomas y Surdin-Kerjan, 1997; Yoshida *et al.*, 2008).

Tabla II. Genes que participan en la ruta de asimilación de sulfato, reducción a sulfito y sulfuro y su incorporación en aminoácidos^a

Gen	Enzima	Descripción
Asimilación de sulfatos		
<i>MET3</i>	ATP sulfurilasa	Cataliza el primer paso de la activación de sulfato intracelular
<i>MET14</i>	APS quinasa	Síntesis de “PAPS”
<i>MET16</i>	PAPS reductasa	Síntesis de sulfito
<i>MET 10</i>	Sulfito reductasa subunidad α	Síntesis de sulfuro
<i>MET5</i>	Sulfito reductasa subunidad β	Síntesis de sulfuro
Vía del Aspartato para formación de homoserina y treonina		
<i>HOM3 ó BOR1 , SIL4</i>	Aspartato quinasa	Cataliza el primer paso en la vía común para la biosíntesis de metionina y treonina.
<i>HOM2</i>	Aspartico beta semi-aldehído dehidrogenasa	Cataliza el segundo paso en la vía común para la biosíntesis de metionina y treonina
<i>HOM6</i>	Homoserina dehidrogenasa	Cataliza el tercer paso en la vía común para la biosíntesis de metionina y treonina
Incorporación del sulfuro para formación de homocisteína		
<i>MET2</i>	Homoserina O-transacetilasa	Síntesis de O-acetilhomoserina a partir de homoserina
<i>MET25 ó MET17, MET15</i>	Homocisteína sintasa	Síntesis de homocisteína
Vía de transulfuración		
<i>CYS4 ó STR4, NHS5, VMA41</i>	Cistationina β sintasa	Síntesis de cistationina
<i>SER2</i>	Fosfoserina fosfatasa	Involucrado en la biosíntesis de serina y glicina
<i>CYS3 ó STR1, CYII, FUN35</i>	Cistationina γ liasa	Síntesis de cisteína
Biosíntesis de Metionina		
<i>MET6 ó MET24</i>	Homocisteína-metiltransferasa	Síntesis de metionina
<i>MET13 ó MET11, MRPL45</i>	Metilentetrahidrofolato reductasa	Cataliza la reducción de 5,10-metiltetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato en la biosíntesis de metionina.
Biosíntesis de S - adenosil- metionina (AdoMet)		
<i>SAM1 ó ETH10</i>	Adomet sintasa I	Síntesis de AdoMet
<i>SAM2 ó ETH2</i>	Adomet sintasa II	Síntesis de AdoMet
<i>MHT1</i>	S-metilmetionin-homocistein-metiltransferasa	Actúa en la conversión de AdoMet a metionina para mantener un equilibrio en la producción de ambos

^a (Adaptado de Thomas y Surdin-Kerjan, 1997; Yoshida *et al.*, 2008; Global Gene Hunter de Stanford Genome Database, 2010).

Ciertos aminoácidos azufrados como la cisteína puede jugar un rol en los niveles de SO_2 y H_2S y cuando hay un aumento de este aminoácido, se incrementan los niveles de los dos compuestos azufrados. Esto se puede deber a que cisteína induce al gen *MET3* que codifica para la enzima ATP sulfurilasa, y al mismo tiempo, reprime los genes *CYS4* (ó *STR4*) y *CYS3* (ó *STR1*) que codifican las enzimas de Cistationina β sintetasa y Cistationina γ liasa respectivamente (Duan *et al.*, 2004).

En cuanto a aminoácidos no azufrados, se ha reportado que la adición de treonina al medio afecta la expresión del gen *MET2* (responsable de la formación de O-acetilhomoserina, que junto a H_2S forman homocisteína, precursor de metionina), disminuyendo la formación de O-acetilhomoserina y aumentando la producción del sulfito y sulfuro por la levadura. Esto ocurre probablemente por la inhibición por retroalimentación de la enzima aspartato quinasa debido a la treonina (Hanser *et al.*, 1996). Sin embargo otros aminoácidos como serina, glutamina, aspartato y arginina se cree que inhiben la formación de H_2S (Vermeulen *et al.*, 2006).

Investigaciones previas han aportado la evidencia de que el tipo de cepa de levadura, y por consiguiente su carga genética, es una variable importante en la producción de H_2S y que puede responder de diferente forma bajo ciertas condiciones de factores medioambientales y fisiológicos (Linderholm *et al.*, 2007). Es por ello que la finalidad del presente trabajo es comprender la maquinaria de expresión de los genes involucrados en la producción de H_2S en cepas cerveceras mediante técnicas moleculares y analizar su regulación bajo condiciones de fermentación.

6.0 METODOS

6.1 Diseño Experimental

Para el análisis transcripcional global por medio de microarreglos, se diseñaron fermentaciones experimentales con un diseño factorial 2^3 , teniendo como variables: cepa, mosto y vitalidad de la levadura como se muestra en la tabla III. Este análisis genero 8 fermentaciones cada una por duplicado.

Tabla III. Diseño de fermentaciones para análisis de microarreglos

Factor	Condición prueba	Condición control
Viabilidad de la levadura	Baja	Alta
Mosto	1	2
Cepa	820	790

Posteriormente una vez identificados los genes que sufrieron efecto según los microarreglos, se montaron fermentaciones con un diseño factorial 2^2 , en donde las variables evaluadas fueron cepa y mosto, generando 4 fermentaciones por duplicado cada una. Después se evaluó la expresión de estos genes analizando la levadura al día 1,2 y 3 de fermentación, extrayendo ARN y sintetizando ADNc; este se llevo a análisis de cuantificación relativa, con el fin de evaluar el nivel de expresión de una cepa con respecto a la otra en las distintas condiciones evaluadas. Para este análisis se utilizó la plataforma estadística Minitab, haciendo un diseño factorial de dos niveles, analizando los efectos de cepa, mosto y su interacción para ciertos genes.

6.2 Cepas de levadura

En este trabajo fueron utilizadas cepas tipo lager denominadas 790 y 820 proporcionadas por Cuauhtémoc Moctezuma Heineken México.

En las fermentaciones para el ensayo de microarreglos, se modifico la viabilidad de la levadura, de la siguiente forma: por una parte fue sometida a una temperatura y tiempo de almacenamiento de 18 horas a 18 °C logrando con esto una baja viabilidad; y otra parte se almaceno 4 horas a 4°C teniendo así la condición de alta viabilidad. Ambas cepas fueron analizadas entre la quinta y sexta generación de reuso.

En las fermentaciones para los ensayos de qPCR únicamente se analizó la condición de baja viabilidad, tomando levadura de cuarta y quinta generación.

6.3 Análisis de viabilidad de levadura

El porcentaje de células viables se determinó por la técnica de microcultivo, siguiendo el protocolo de Yeast-6 de American Society of Brewing Chemists (1992), en donde se consideran como viables las células que son capaces de reproducirse (Apéndice A).

6.4 Mosto

Fueron utilizados 4 mostos proporcionados por la planta experimental de CCM, los primeros dos mostos fueron utilizados para los ensayos de fermentaciones para microarreglos y los otros dos para los análisis de qPCR. En estos mostos se manejaron diferentes porcentajes de malta y adjuntos como se muestra en la tabla XIV. Cada uno con un tuvo una concentración de extracto fermentable de aproximadamente 17°P.

Tabla 1V. Formulación de mostos experimentales para ensayos de microarreglos y qPCR.

	Mosto 1	Mosto 2
Malta (%)	35.00	50.00
Adjuntos (%)	65.00	50.00

Los mostos se muestrearon asépticamente para la determinación de amino nitrógeno libre (FAN), carbohidratos y aminoácidos libres.

Para el análisis de FAN, se siguió el protocolo de Wort-12 de la ASBC edición 8, en el que se determinan grupos amino terminales de péptidos y proteínas, amoniaco y aminoácidos. (Apéndice B). En el análisis de aminoácidos libres se siguió el método de AccQ Tag Waters, el cual consiste en una derivatización por medio del reactivo AccQ Flour (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamato, AQC) que convierte los aminoácidos en fluorescentes a 395 nm; seguida por la técnica de cromatografía de líquidos de alto desempeño reversa (High Performance Liquid Chromatography

“HPLC”) para separar los derivados; por último cuantificandolos por medio de un detector de fluorescencia (técnica detallada en el apendice C).

El análisis de carbohidratos en el mosto, se llevo a cabo por medio de HPLC, adaptado del método descrito en Wort-14 de American Society of Brewing Chemists (1992) (apéndice D)

6.5 Fermentaciones.

En condiciones asépticas, el mosto fue oxigenado a una concentración de 1 ppm por cada °P; una vez realizado este proceso, se inoculo la levadura a 1.2×10^6 cel/ml por cada grado plato para todas las condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente se fermentó en probetas estériles de 2L, por 7 días a una temperatura inicial de $11^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ al día 1 y a $16^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ los días posteriores. Terminado los 7 días de fermentación, la levadura fue cosechada y se realizó análisis de microcultivo para determinar viabilidad celular. En la figura 2 se pueden observar las condiciones experimentales de fermentación en una incubadora de temperatura controlada.



Figura 2. Fermentaciones en probetas de 2 L.

6.6 Parámetros monitoreados durante la fermentación

6.6.1 Células en suspensión y diacetilo: Con el objetivo de evaluar el desempeño de la fermentación se analizaron las células en suspensión durante la misma usando el protocolo de Yeast- XX de ASBC edición 8. En una cámara de Neubauer, fue colocada una gota del líquido, contando las células en el microscopio con el objetivo de 40X.

Cálculos:

$$\text{Cel/ml} = \text{Células totales (en 25 cuadrantes)} \times \text{la dilución} \times 10,000\text{cm}^3$$

La medición de diacetilo al final de la fermentación realizada por de cromatografía de gases siguiendo el procedimiento de la ASBC en el método de Beer-25 inciso E. La metodología se detalla en el apéndice E.

6.6.2 Siembras microbiológicas

Fue realizado un análisis microbiológico al líquido en el séptimo día con el fin de verificar que todo el proceso haya estado libre de microorganismos contaminantes, ya que como se menciona en los antecedentes, bacterias gram (-) pueden favorecer al acumulo de compuestos volátiles de azufre. Se utilizaron los medios de cultivo DUBA y MRS siguiendo los métodos de American Society of Brewing Chemists (1992)

6.7 Análisis transcripcional global por medio de Microarreglos

Fue extraído ARN total al día 2 de fermentación de la cepa 820 y 790 usando el protocolo de extracción establecido por Schmitt y colaboradores (1990), el cual se basa en la adición de fenol caliente a la suspensión de células y su posterior shock térmico a -70°C con el fin de formar cristales que rompen las células para la posterior extracción de ácidos nucleicos por fases usando fenol:cloroformo:isoamilico (detallado en Apéndice F). Se realizó análisis transcripcional global mediante microarreglos de ADN en el Instituto de Fisiología de la UNAM (Universidad Autónoma de México). El diseño de las combinaciones de cepas y variables a probar, dieron por resultado 4 microarreglos con análisis “swaps” (este análisis es para invertir el marcaje fluorescente en el duplicado, para evitar datos espurios) marcando el ADNc de los transcritos de la levadura con Cy3 y Cy5; siguiendo el protocolo de Promega kit Z3604 tal como se

muestra en la tabla V (la metodología se detalla en el apéndice G). La condición control fue la viabilidad alta de levadura con Mosto 2 y la condición prueba fue la vitalidad baja con Mosto 1. Los resultados se analizaron en base al criterio de Z score mayor a 1.5 y evaluó el nivel de expresión en los genes involucrados en la generación de compuestos volátiles de azufre.

Tabla V. Diseño de microarreglos.

Cepa	Condición	Cy3	Cy5	
820	Control	X		Swap
820	Prueba		X	
820	Control		X	
820	Prueba	X		
790	Control	X		Swap
790	Prueba		X	
790	Control		X	
790	Prueba	X		

6.8 Diseño de iniciadores

Las secuencias nucleotídicas fueron obtenidas de “National Center for Biotechnology Information” (NCBI, 2010) y Global Gene Hunter de Standford Genome Database (SGD, 2010). Para el diseño de los oligos se utilizó el programa IDT DNA y para las pruebas de alineamiento los programas DNA STAR Inc., Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Se consideraron para el diseño siguientes parámetros: porcentaje de GC entre 30 y 60%; tener 20 a 24pb y que el tamaño del amplicon este dentro del estándar establecido para qPCR entre 100 a 300 pb. Antes de utilizarlos, los iniciadores fueron diluidos a 100 μ M en agua libre de nucleasas y almacenados a -20°C hasta su uso.

6.9 Verificación de iniciadores

6.9.1 Extracción de ADN total: Para verificar el funcionamiento de los iniciadores, se extrajo ADN de levadura, utilizando la técnica incluida en el manual Twintrack Advanced Labs (Siebel Inst. of Technology, 2006), que se basa en una lisis celular en buffer con Tris, EDTA y SDS a una temperatura de 60°C. Posteriormente se realizó una extracción de ácidos nucleicos de la siguiente forma: se transfirieron alícuotas de cultivo homogenizado de levadura en tubos de 1.5ml, centrifugando por 10 min a 14000 rpm. El sobrenadante se descartó y al paquete celular le fueron agregados 660 µl de 50 TE-10%SDS (EDTA, 3.7g; Tris, 3.03g en 1 L ajustando el pH a 7.5. Posteriormente se mezclaron 200 ml de la solución anterior con 20 ml de SDS al 10% previamente esterilizado por filtración). Fue agitado e incubado a 65°C por 10 min, homogenizando por inversión después de 5 min. Realizado esto, se agrego 660 µl de mezcla de fenol-cloroformo-isoamilico (25:24:1), homogenizando y centrifugando a 14000 rpm por 2 min.

Se transfirieron 660 µl de sobrenadante a un tubo limpio agregando 660 µl de isopropanol absoluto para luego mezclarse por inversión y centrifugarse 20 min a 10000 rpm. Terminado este tiempo, se realizaron dos lavados de 200 µl de etanol al 75%, centrifugando 2 min a 10000 rpm. Por último se removió el etanol y se agrego 100 µl de agua libre de nucleasas, para después adicionar 0.5 µl de RNAsa One (Promega) a concentración 10 U/µl e incubando a 37°C por 30 min. Transcurrido este tiempo se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.9.2 Amplificación de fragmentos génicos por PCR: Para verificar que los iniciadores seleccionados amplifiquen lo esperado, se utilizó el kit comercial “LightCycler 480 Sybr Green I Master”, usando la mezcla de reacción que se presenta en la tabla VI, y la amplificación se elaboro con el equipo de PCR tiempo real “LightCycler 480” (Roche Applied Science) siguiendo el protocolo de la tabla VII.

Tabla VI. Mezcla de reacción para amplificación de genes

Componente	Conc. stock	Conc. deseada	μL/reacción
Agua grado PCR			3.0
Oligos	2.0 μM	0.1 μM	2.0
Master Mix	2X	1X	10.0
ADN	1μg	1μg	5.0
Total			20.0

Tabla VII. Condiciones del termociclador para la detección de genes.

Tipo de Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura °C	Tiempo	Modo de adquisición
Pre-incubación					
Desnaturalización	1		95	00:05:00	“None”
Amplificación					
Cuantificación	45	Desnaturalización	95	00:00:10	“None”
		Alineamiento	60 / 55	00:00:10	“None”
		Extensión	72	00:00:10	“single”
Curva de disociación					
Curva “melting”	1	Desnaturalización	95	00:00:01	“None”
		Alineamiento	65	00:00:01	“None”
		“Melting”	95	-	“continuos”
Enfriamiento					
Ninguno	1		40	00:00:30	“none”

6.9.3 Verificación del tamaño de amplicones: Se verificó y comparó el tamaño de los amplicones de cada experimento realizando electroforesis en gel de agarosa al 2.0 %. El tamaño de los fragmentos obtenidos fueron comparados con lo estimado por los programas de PCR *in silico*.

6.9.4 Electroforesis en gel de agarosa: Los productos de amplificaciones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa. En cada pozo se colocó 7.0μl de muestra (5.0 μl de producto de PCR mas 2.0 μl de carga). Se utilizó como marcador de

peso molecular Hyperladder V con un rango de 25 a 500 pb. Las muestras fueron separadas a 85V/ 90 min con buffer TBE al 1X (0.9M Tris-borato; 0.002M EDTA (pH 8.0). Transcurrido el tiempo se colocó el gel a un transluminador (UVP) con longitud UV baja para su visualización y fotodocumentación.

6.10 Cuantificación de ADN y ARN

Fue usado el espectrofotómetro Smart Spec 3000 (BioRad), en donde se diluyo la muestra 1:100 en agua libre de nucleasas, y se colocaron 50.0µl, leyendo a 260/280 nm.

6.11 Fermentaciones para análisis de expresión por qPCR.

Para las fermentaciones se utilizó un diseño factorial de dos niveles con dos factores (cepa y mosto), por duplicado, generando así 8 fermentaciones en total. En muestra en la tabla VIII.

Se muestran niveles y factores utilizados.

Tabla VIII. Diseño de fermentaciones para análisis de expresión génica.

Factores	Niveles	
	Condición prueba	Condición control
Mosto	1	2
Cepa	820	790

6.11.1 Curvas estándar para tomar eficiencia máxima de iniciadores: Uno de los parámetros requeridos para realizar una cuantificación relativa, es la eficiencia de los iniciadores, a fin de corregir el cálculo de la expresión génica. Para ello, fueron realizadas curvas estándar por PCR cuantitativa a 7 puntos por triplicado (usando el protocolo de las tablas VI y VII), haciendo diluciones seriales 1:10 de amplicones generados de las reacciones de amplificación mencionadas en el apartado 6.9.2.

6.11.2 Extracción de ARN Total: Se extrajo ARN de levadura los días 1, 2 y 3 de fermentación, bajo las variables mencionadas en el apartado 6.11. Fue utilizado el reactivo Tripure (Roche Applied Science) en donde la lisis celular y la desnaturalización de nucleasas se realizan en un solo paso debido a los componentes de la solución (isotiocianato de guanidina y fenol). Al agregar cloroformo seguido de una breve centrifugación la solución se separa en tres fases, obteniendo el ARN, proteínas y ADN por separado. Una vez extraído el ARN se almacena a -70°C hasta su posterior uso.

6.11.3 Obtención de ADNc: El ARN total fue cuantificado para saber su concentración y pureza. Para la PCR reversa se utilizó el kit “Reverse Transcription M MLV” (Promega), con la mezcla de los reactivos mencionados en la tabla IX y ajustando la cantidad de ARN a 2 µg. Las condiciones del termociclador se ajustaron a las rampas de temperaturas como se menciona en la tabla X. El ADNc se almacenó a -20°C hasta su uso.

Tabla IX. Mezcla de reacción para la obtención de ADNc a partir de ARN total mediante PCR reversa.

Componente	Conc. Inicial	Conc. deseada	µL/reacción
Agua miliQ			Variable
Buffer	5X	1X	5.0
RNasin	40 U/µl	20 U	0.5
dNTP's	10 mM	2 mM	5.0
Oligo(dT)	0.5 µg/ml	0.5 ng	1.0
ARN total	Variable	2.0 µg	Variable
M MLV-RT	200 U/µl	400 U	2.0
Total			25.0

Tabla X. Condiciones del termociclador para la obtención de ADNc a partir de ARN total.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
25	00:05:00	1
37	00:60:00	
70	00:10:00	
4	indefinido	

6.11.4 Medición de la expresión genética por qPCR: Para determinar las variaciones en los niveles de expresión de los genes seleccionados, bajo las distintas variables en los tres primeros días de fermentación, se optó por un análisis de cuantificación relativa, usando las condiciones prueba y control mencionados en la tabla VIII. Para estos ensayos se requiere del uso de un gen constitutivo ó gen de referencia en donde la síntesis de ARNm se mantenga estable bajo distintos tratamientos. En este estudio se seleccionó como gen de referencia *ACT1*. Para los ensayos, fue utilizado el kit y equipo mencionado en el apartado de amplificación así como las condiciones en el termociclador mencionadas en la tabla VII. Para la detección de transcritos en general, se utilizó siguiente la mezcla de reacción:

Tabla XI. Mezcla de reacción para análisis de expresión genética.

Componente	Conc. stock	Conc. deseada	µL/reacción
Agua grado PCR			3.0
Oligos	2.0 µM	0.1 µM	1.0
Master Mix	2X	1X	5.0
ADNc			1.0
Total			10.0

Se incluyeron controles positivos de la misma cepa en estudio según el caso, usando 1 µg de ADN. Para los controles negativos se sustituyó el material genético por agua. Cada muestra se colocó en una placa de 96 pozos por triplicado con el fin de confirmar la exactitud y repetitividad del ensayo. Se tomaron en cuenta los Cp (por su nombre en inglés “crossing point”) de los amplicones, en donde este parámetro es inversamente

proporcional a la concentración inicial de transcrito presente en la muestra y representa el punto de aumento de fluorescencia en donde la muestra pasa la línea basal y ésta es registrada por el equipo.

6.12 Análisis Estadísticos

6.12.1 Concentración de aminoácidos en mostos: En mostos para análisis de qPCR, fue usada la prueba de t-student para cada aminoácido, aplicando la prueba de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995), para determinar si existían diferencias significativas en sus concentraciones.

6.12.2 Ensayos de cuantificación relativa: Primeramente se realizó una corrección de C_p en base a la eficiencia de cada par de iniciadores generada mediante las curvas estandar. Una vez realizado esto se obtuvo diferencia entre el C_p' del gen de interés - C_p' del gen de referencia (ACT1) en cada tratamiento, dando por resultado un “ ΔC_p ”, en donde a mayor $\Delta C_p'$ significa menor expresión ya que la diferencia entre el gen de interés y el gen de referencia es mayor, y si hay un menor $\Delta C_p'$, se tiene mayor expresión. Este valor se introdujo en la plataforma estadística Minitab 15, en donde se estableció un análisis factorial, tomando en cuenta los datos que tuvieran un efecto significativo con un $\alpha \leq 0.05$, para los efectos de cepa, mosto e interacción cepa-mosto. Posteriormente en los genes con efecto significativo, se realizó el análisis de “ $\Delta\Delta C_p$ ”, con el fin de comparar los resultados de expresión relativa entre tratamientos, determinando las diferencias entre cepas y mostos, usando la siguiente fórmula: $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$ (Pfaffl, 2001; Fu W. et al., 2006).

7.0 RESULTADOS

7.1 Fermentaciones para análisis de microarreglos

7.1.1 Análisis de Alfa amino nitrógeno libre en mostos: A los mostos experimentales se les realizó un análisis para determinar el contenido de Alfa amino nitrógeno libre (FAN) presente, los resultados se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. FAN en mostos para ensayos de microarreglos

Mosto 1 (ppm)	Mosto 2 (ppm)
133	171

7.1.2 Análisis de expresión global por medio de microarreglos: Con el fin de identificar los genes involucrados en la producción de compuestos de azufre, se realizaron análisis de expresión global mediante microarreglos de ADN en células de levadura expuestas a diferentes condiciones de viabilidad y dos tipos de mostos con diferentes concentraciones de nutrientes. Utilizando los softwares mencionados en el apartado de métodos, se tomó como criterio un valor Z score >1.5 . Fueron determinados los genes que presentaron cambios en sus niveles de expresión, en donde fueron seleccionados genes sobre expresados (>1.5) y genes reprimidos (<-1.5). En la tabla XIII se muestra un resumen de los resultados obtenidos y en la figura 3 se muestra la ubicación de cada gen seleccionado, en la ruta metabólica de asimilación de sulfatos, reducción de sulfitos y asimilación de aminoácidos azufrados.

Tabla XIII. Efecto en genes relacionados a la generación de compuestos de azufre.

Gen	Cepa 820	Cepa 790
CBF1	-	-
MET 28	-	SC
MET 31	-	SC
MET 32	SC	+
MET 4	SC	SC
MUP 3	+	+
MET 3	+	SC
MET 14	SC	SC
MET16	SC	SC
MET 5	SC	SC
MET 10	SC	SC
MET 25	SC	SC
HOM 3	SC	SC
HOM 2	SC	SC
HOM 6	SC	SC
MET 2	+	SC
MET 13	-	SC
MET 6	-	SC
SAM 1	SC	SC
SAM 2	SC	SC
MHT1	-	+
SER 2	SC	SC
CYS 4	SC	SC
CYS 3	SC	SC

“+”: sobre expresión; “-” represión; “SC”: sin cambio

7.2 Parámetros monitoreados durante la fermentación para microarreglos.

7.2.1 Viabilidad celular: La condición de viabilidad de la levadura fue analizada determinando el porcentaje de células viables previo a la inoculación, así como en la cosecha de levadura (Tabla XIV), obteniendo valores mayores al 90% de células viables capaces de reproducirse.

Tabla XIV. Porcentaje de células viables, en la levadura de inóculo y en cosecha.

Cepa / temperatura y tiempo de almacenamiento	Levadura de inóculo	Levadura de cosecha
790 (4°C por 4h)	98.09	95.1
790 (18°C por 18h)	94.15	90.99
820 (4°C por 4h)	96.7	96.09
820 (18°C por 18h)	93.02	92.54

7.2.2 Diacetilo al final de la fermentación y análisis microbiológicas:

Respecto a la reducción de diacetilo al séptimo día de fermentación los valores estuvieron en el rango de 0.19 y 0.29 sin diferencia significativa entre los tratamientos estando dentro de los valores aceptados para cervezas tipo lager. Con respecto a siembras microbiológicas en medios de cultivo selectivos, no se detectó contaminación microbiana.

7.3 PCR tiempo real

7.3.1 Diseño de iniciadores: Para el diseño de iniciadores para qPCR, se tomaron en cuenta genes que sufrieron cambios en su expresión en microarreglos, al igual que otros genes que se consideraron importantes para los análisis. En la tabla XV se muestran las secuencias y sus características.

Tabla XV. Iniciadores utilizados para análisis de qPCR

Nombre	Secuencia (5' - 3')	TM (°C)	%GC	Tamaño de fragmento (pb)
<i>MET3 F</i>	TTGCGTAAGACACCTGCCCAACTA	60.2	50.0	140
<i>MET3 R</i>	TTAGCATTAGCTTCTCTGGCGGCT	60.4	50.0	
<i>MET4 F</i>	ACGCTGTCACGCCAGAAATACTCT	60.1	50.0	146
<i>MET4 R</i>	GCTGAAAGTGTCCGCGCCATTATT	60.3	50.0	
<i>CBF1 F</i>	TTTGGCCACAACAGACGAGTGGAA	60.8	50.0	153
<i>CBF1 R</i>	GCACACGCCAATATTGCTGCCTTA	60.3	50.0	
<i>MET28 F</i>	ATAATGGCCAGGATGTCTCGCAGT	60.0	50.0	169
<i>MET28 R</i>	TGCGACGCCTCTGTGTTCTTTCTT	60.9	50.0	
<i>MET32 F</i>	CCCCAAGATCGTAGAAATAGTAC	52.3	43.4	320
<i>MET32 R</i>	CAGCCATTACTGCTACCATTTGTGG	58.1	50.0	
<i>MET31 F</i>	CAGGAGGTAACAACCATAGCAAGG	63.1	50.0	243
<i>MET31 R</i>	CTACATCAACGTCTGAACCTTCAC	60.1	45.83	
<i>MET25 F</i>	AACACATTTGGTGCCGGTGGTTAC	60.0	50.0	153
<i>MET25 R</i>	TGGGTAGTCCTTCCATGGGAAGT	59.7	50.0	
<i>MET2 F</i>	ACGATAAATGAGGAGACGGGCGTT	60.0	50.0	183
<i>MET2 R</i>	TTCCTTACCATACATGGCAGCCCA	60.4	50.0	
<i>MET13 F</i>	TACTTCCATCAACGACGTCGCCTT	60.0	50.0	176
<i>MET13 R</i>	TGCCGTTGACTTGAGGTTGAGAGT	60.4	50.0	
<i>MET6 F</i>	AGACCTGTCTTGTGTTGGTCCAGTT	59.9	50.0	146
<i>MET6 R</i>	GTGGCACCAGCAGAAGCCAATTTA	60.2	50.0	
<i>MHT1 F</i>	ACGAGACGGTACCACTTTGGAAGA	59.4	50.0	167
<i>MHT1 R</i>	AAACTAGCAGAGGCATGCCAGGTA	60.3	50.0	
<i>ACT1 F</i>	ACGTTCCAGCCTTCTACGTTTCCA	60.4	50.0	103
<i>ACT1 R</i>	ACGTGAGTAACACCATCACCGGAA	60.2	50.0	
<i>HOM2 F</i>	CATGGAAGCTGGTATCGCCATTGT	57.5	50.0	151
<i>HOM2 R</i>	TGGTCTTGGCTTACCTTGAGCCTT	58.0	50.0	
<i>HOM6 F</i>	GTTGGTTCTGATTGGAAGGCTGCT	57.6	50.0	136
<i>HOM6 R</i>	CAGCAATGTAAGCGCTGGAAGTGT	58.2	50.0	
<i>HOM3 F</i>	TTGCCCATTCAGATGCAGACTCA	58.3	50.0	155
<i>HOM3 R</i>	AACATGGTACCAGCAATGCCGATG	58.0	50.0	
<i>CYS4 F</i>	ACTGTGAAGACCACCCTGAACTGA	57.42	50.0	139
<i>CYS4 R</i>	GCCAACACGTCATCATCCACAAA	58.19	50.0	
<i>CYS3 F</i>	TCCCATCTCCTTTTCGATGCTTGGT	57.90	50.0	150
<i>CYS3 R</i>	TCAAACCTGGGTAGTTGACTGCGA	58.04	50.0	
<i>SER2 F</i>	GCCGCTTATGCTGGTGTGTAAGAA	58.26	50.0	186
<i>SER2 R</i>	CTTGCATAGTTCTGGCACACCCTT	57.40	50.0	

7.3.2 Detección de amplicones de genes seleccionados: En cada caso, los iniciadores de PCR diseñados, amplificaron el fragmento de tamaño esperado, evaluando por qPCR las curvas de disociación (Apendice H). Mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa fue posible descartar la presencia de bandas inespecíficas; en la figura 4 se muestran los fragmentos de cada gen en las cepas de estudio.

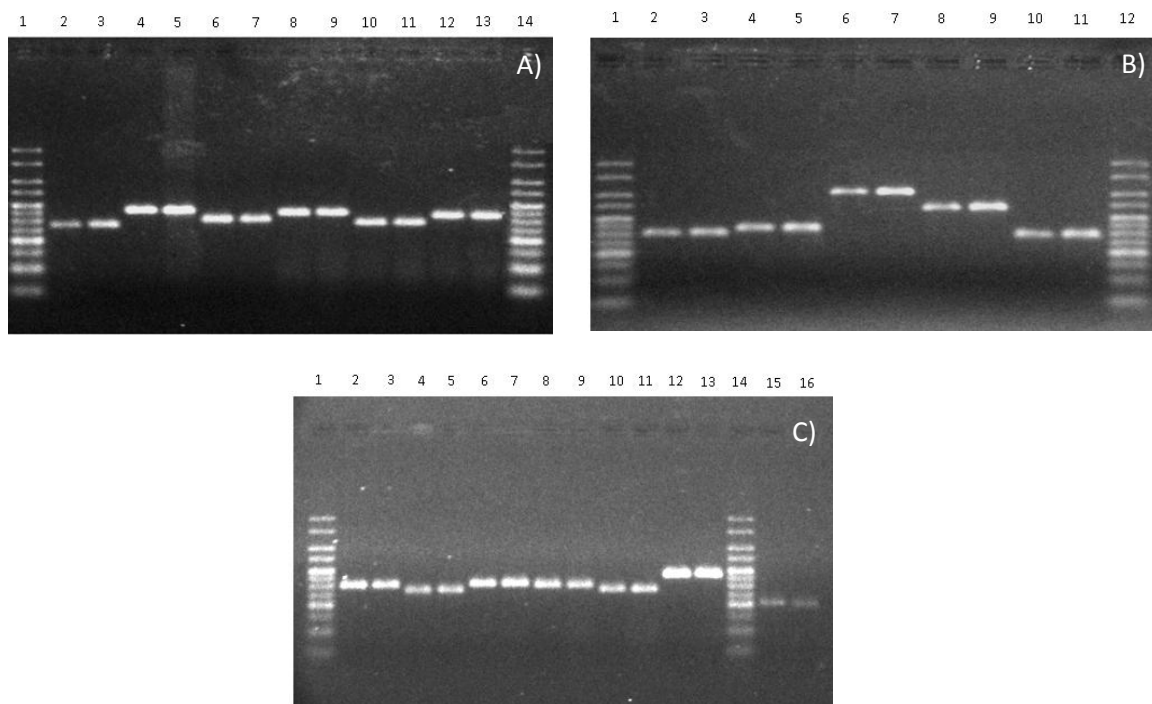


Figura 4. Productos de PCR tiempo real de genes seleccionados en la cepa 820 y 790. (A) carriles 1, marcador de peso molecular de 500 pb; 2, MET3 cepa 820 (140pb); 3, MET3 cepa 790; 4, MET2 cepa 820 (151pb); 5, MET2 cepa790; 6, MET25 cepa 820 (153pb); 7, MET25 cepa 790; 8, MET13 cepa 820 (176pb); 9, MET13 cepa 790; 10, MET6 cepa 820 (146pb); 11, MET6 cepa 790; 12, MHT1 cepa 820 (167pb); 13, MHT1 cepa 790; 14, marcador de peso molecular de 500 pb. (B) carriles 1, marcador de peso molecular de 500 pb; 2, CBF1 cepa 820 (153pb); 3, CBF1 cepa 790; 4, MET28 cepa 820 (169pb); 5, MET28 cepa 790; 6, MET32 cepa 820 (320pb); 7, MET32 cepa 790 ; 8, MET31 cepa 820 (243pb); 9, MET31 cepa 790; 10, MET4 cepa820 (146pb); 11, MET4 cepa 790; 12, Marcador de peso molecular de 500pb. (C) carriles 1, marcador de peso molecular de 500pb; 2, HOM2 cepa 820 (151pb); 3, HOM2 cepa790; 4, HOM6 cepa 820 (136pb); 5, HOM6 cepa 790; 6, HOM3, cepa 820 (155pb); 7, HOM3 cepa 790; 8, CYS3 cepa 820 (150pb); 9, CYS3 cepa 790; 10, CYS4 cepa 820 (139pb); 11, CYS4 cepa 790; 12, SER2 cepa 820 (186pb); 13, SER2 cepa 790; 14, marcador de peso molecular de 500pb; 15, ACT1 cepa 820 (103pb); 16, ACT1 cepa 790

7.4 Fermentaciones para análisis de expresión por qPCR

7.4.1 Nutrientes del mosto: En los dos mostos utilizados se realizaron análisis de FAN así como otros nutrientes (tabla XVI) siendo el FAN el parámetro que obtuvo diferencias significativas entre los mostos, mientras que los demás parámetros se mantuvieron dentro de los rangos establecidos para una fermentación tipo lager. En el perfil de aminoácidos libres, algunos resultaron con efecto significativo en la prueba t-student (Tabla XVII). Adicional, se determinó el porcentaje de cada aminoácido con respecto al total, aplicando la prueba de Benjamini-Hocherg con la finalidad de tener un modelo más preciso con respecto a los aminoácidos estadísticamente significativos (Urrea, 2009). Los aminoácidos con diferencia significativa en su concentración fueron: ácido aspártico, glicina, arginina, glutámico, serina y treonina (Fig. 5).

Tabla XVI. Resultados analíticos de nutrientes de los mostos para ensayos de qPCR

Parámetro	Mosto 1 (ppm)	Mosto 2 (ppm)
FAN (mg/L)	150 ± 2.8	204 ± 7.07
Zinc (mg/L)	0.93	1.02
Calcio (mg/L)	47.72	42.42
Sulfato como SO ₄ (mg/L)	18.04	18.96
Maltosa (%)	9.30	9.45
Glucosa (%)	.95	1.40
Fructosa (%)	0.16	0.22
Maltotriosa (%)	2.45	2.57

Tabla XVII. Perfil de aminoácidos de mostos para análisis de qPCR.

Aminoácidos	Mosto 1 (mg/L)	Mosto 2 (mg/L)	P value	Composición porcentual de aminoácidos		Veces de incremento ó disminución relativa en base al porcentaje de cada aminoácido de mosto 2 con respecto a mosto 1
				Mosto 1	Mosto 2	
Aspártico	0.85 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.0332	0.37	0.18	0.50
Serina	0.29 ± 0.08	3.5 ± 0.07	0.0007	0.13	1.10	8.68
Glutámico	5.04 ± 0.38	0.78 ± 0.15	0.0212	2.19	0.24	0.11
Glicina	1.2 ± 0.01	1.38 ± 0.01	0.0061	0.52	0.43	0.83
Histidina	4.7 ± 0.54	5.45 ± 0.63	0.3328	2.05	1.71	0.83
Arginina	4.25 ± 0.08	4.18 ± 0.08	0.4547	1.85	1.31	0.71
Treonina	4.01 ± 0.06	7.63 ± 0.01	0.0054	1.75	2.39	1.37
Alanina	20.34 ± 1.11	29.18 ± 2.89	0.1106	8.86	9.14	1.03
Prolina	38.45 ± 1.04	44.45 ± 1.77	0.0726	16.74	13.93	0.83
Tirosina	19.84 ± 1.20	32.39 ± 4.22	0.1273	8.64	10.15	1.17
Valina	22.15 ± 0.38	31.69 ± 0.45	0.0021	9.65	9.93	1.03
Metionina	7.12 ± 0.56	9.81 ± 0.69	0.0545	3.10	3.07	0.99
Lisina	4.57 ± 0.02	4.34 ± 0.31	0.4923	1.99	1.36	0.68
Isoleucina	17.7 ± 0.15	25.92 ± 1.29	0.0675	7.71	8.12	1.05
Leucina	41.38 ± 3.24	59.91 ± 2.96	0.0274	18.02	18.77	1.04
Fenilalanina	37.76 ± 3.52	57.96 ± 3.54	0.0292	16.44	18.16	1.10
Total	229.65 ± 3.52	319.16 ± 9.04	0.0454			

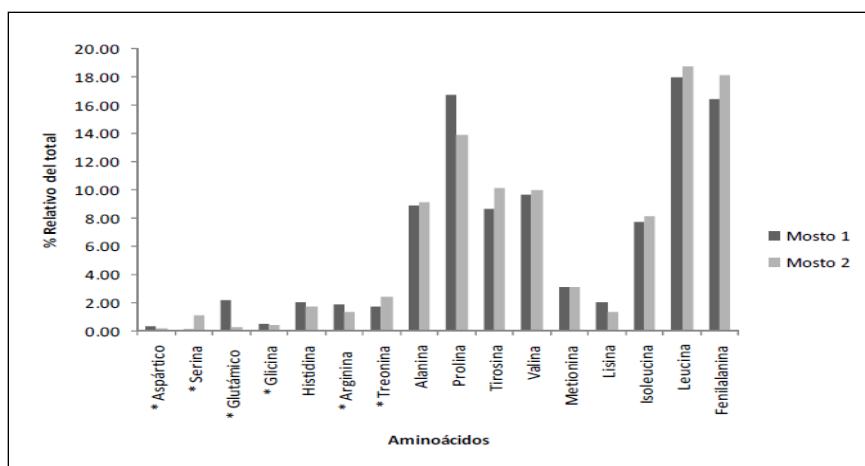
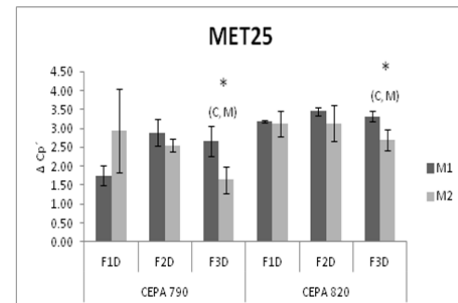
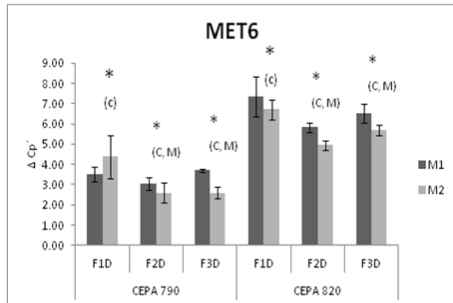
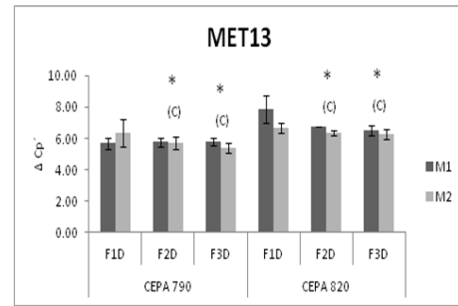
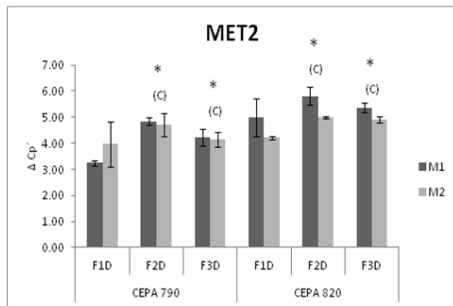
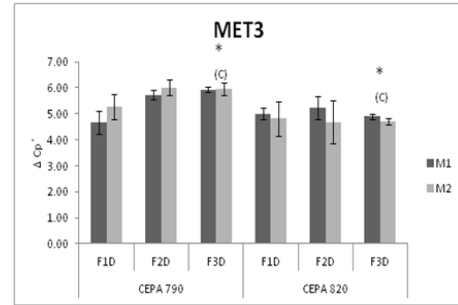
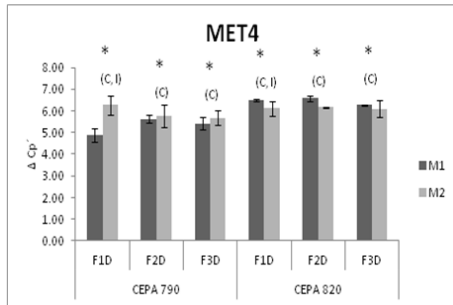
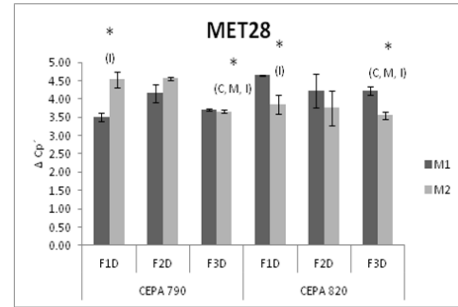
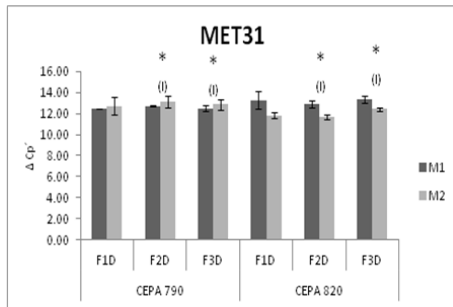
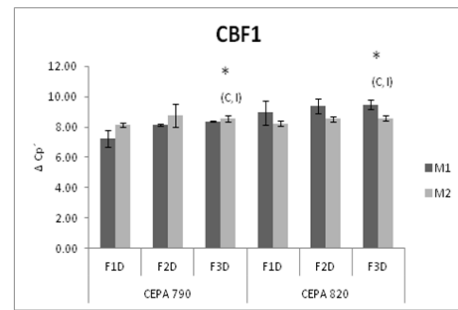
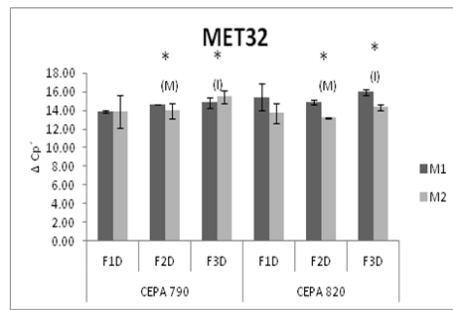


Figura 5. Porcentaje de aminoácidos con respecto al total de cada mosto. El signo de “*” indica diferencias significativas entre los mostos según la prueba de Benjamini-Hochberg.

Al final de fermentación se determinó el contenido de todos los aminoácidos mencionados, demostrando que los aminoácidos considerados dentro del grupo A y B son agotados por la levadura, detectándose valores traza, o en algunos casos fueron no detectables. En todos los tratamientos, los aminoácidos que tuvieron mayor cantidad residual fueron alanina y tirosina pertenecientes al grupo C y prolina del grupo D (datos no mostrados).

7.4.2 Análisis de expresión de los genes relacionados a la producción de compuestos de azufre: Siguiendo el apartado 6.12.2 de la sección de métodos, se determinaron los valores de ΔC_p con cambios significativos de expresión ($p < 0.05$), obteniendo mediante este análisis efectos de cepa, mosto e interacción cepa-mosto en algunos genes, (Fig. 6). Posteriormente se ilustra en la tabla XVIII los genes con efecto de cepa y mosto al día 1, 2 y 3 de fermentación, ubicándolos en la ruta metabólica de las figuras 7, 10 y 13. Después se obtuvo el valor $\Delta\Delta C_p'$ para determinar el valor de la diferencia entre cepas y mostos (Figs. 8, 11, 14). Por último se presentan las graficas de interacción cepa-mosto en donde se visualizan las diferencias de expresión de las dos cepas frente a los dos tipos de mostos (Figs. 9, 12 y 15).



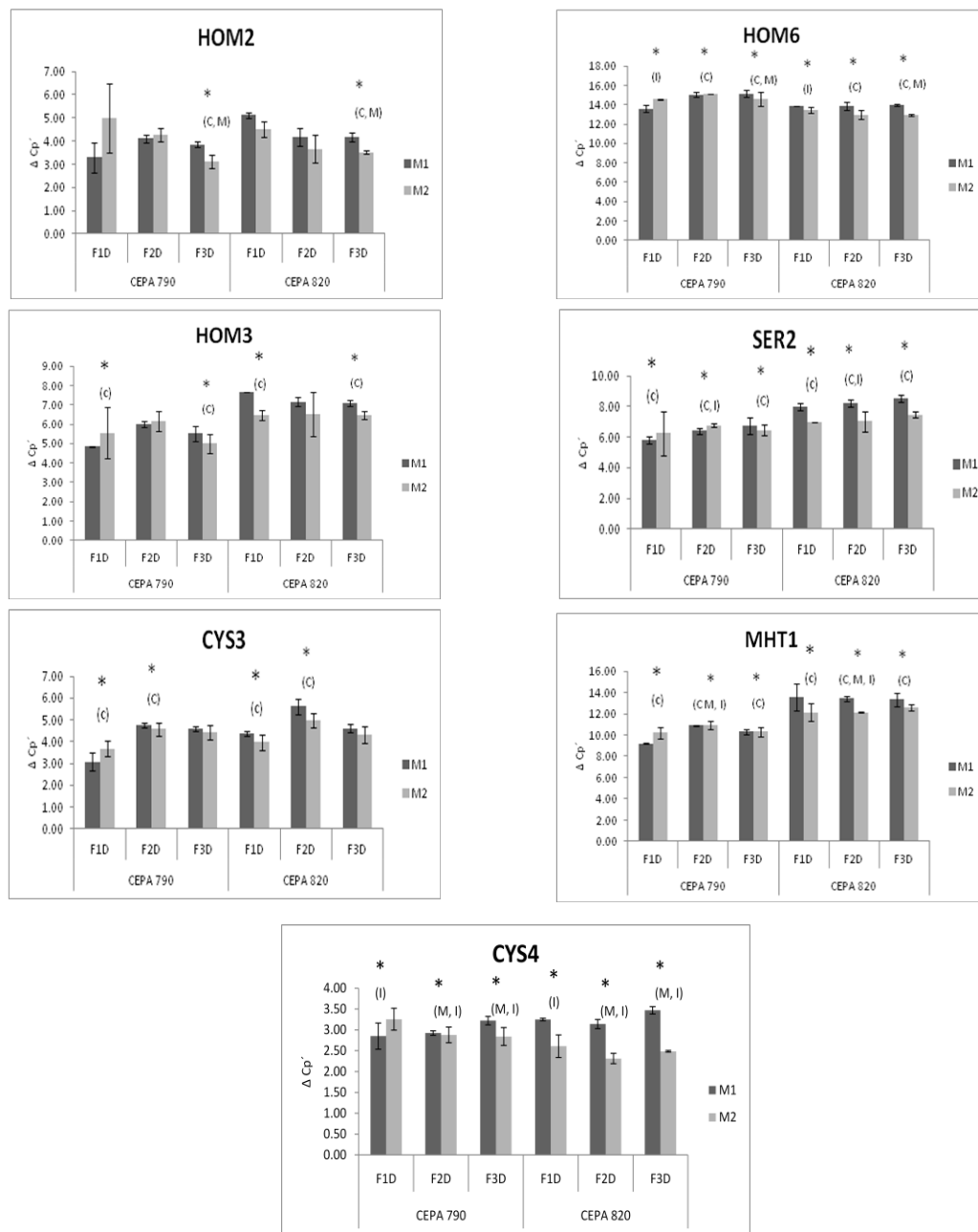


Figura 6. Graficas de valor $\Delta C_p'$ de cada gen, al día 1 (F1D), día 2 (F2D) y día 3 (F3D) de fermentación, en Mosto 1 y Mosto 2 en la cepa 790 y 820, representando con un “*” donde hubo efecto significativo ($p < 0.05$) de “C”, cepa, “M”, mosto, “I”, interacción cepa-mosto.

A continuación en la tabla XVIII se detalla genes con diferencias significativas entre cepas y mostos ($p < 0.05$) y sin diferencias en los tres días de fermentación.

Tabla XVIII. Cambios significativos de expresión a nivel de cepas y mostos en el día 1, 2 y 3 de fermentación.

Gen	790			820			Mosto 2			Mosto 1		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
CBF1	SC	SC	+	SC	SC	-	SC	SC	SC	SC	SC	SC
MET28	SC	SC	+	SC	SC	-	SC	SC	+	SC	SC	-
MET31	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
MET32	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	+	SC	SC	-	SC
MET4	+	+	+	-	-	-	SC	SC	SC	SC	SC	SC
MET3	SC	SC	-	SC	SC	+	SC	SC	SC	SC	SC	SC
MET25	SC	SC	+	SC	SC	-	SC	SC	+	SC	SC	-
HOM3	+	SC	+	-	SC	-	SC	SC	SC	SC	SC	SC
HOM2	SC	SC	+	SC	SC	-	SC	SC	+	SC	SC	-
HOM6	SC	-	-	SC	+	+	SC	SC	SC	SC	SC	SC
MET13	SC	+	+	SC	-	-	SC	SC	SC	SC	SC	SC
MET6	+	+	+	-	-	-	SC	+	+	SC	-	-
MHT1	+	+	+	-	-	-	SC	+	SC	SC	-	SC
SER2	+	+	+	-	-	-	SC	SC	SC	SC	SC	SC
CYS4	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	+	+	SC	-	-
CYS3	+	+	SC	-	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC

“+”: mayor expresión de una cepa con respecto a la otra o un mosto con respecto al otro; “-”: menor expresión de una cepa con respecto a la otra o un mosto con respecto al otro; SC: sin cambio significativo.

Día 1 de fermentación

A continuación se detalla las diferencias significativas en el día1 entre cepas, mostos y su interacción, ubicándolos en la ruta en la figura 7.

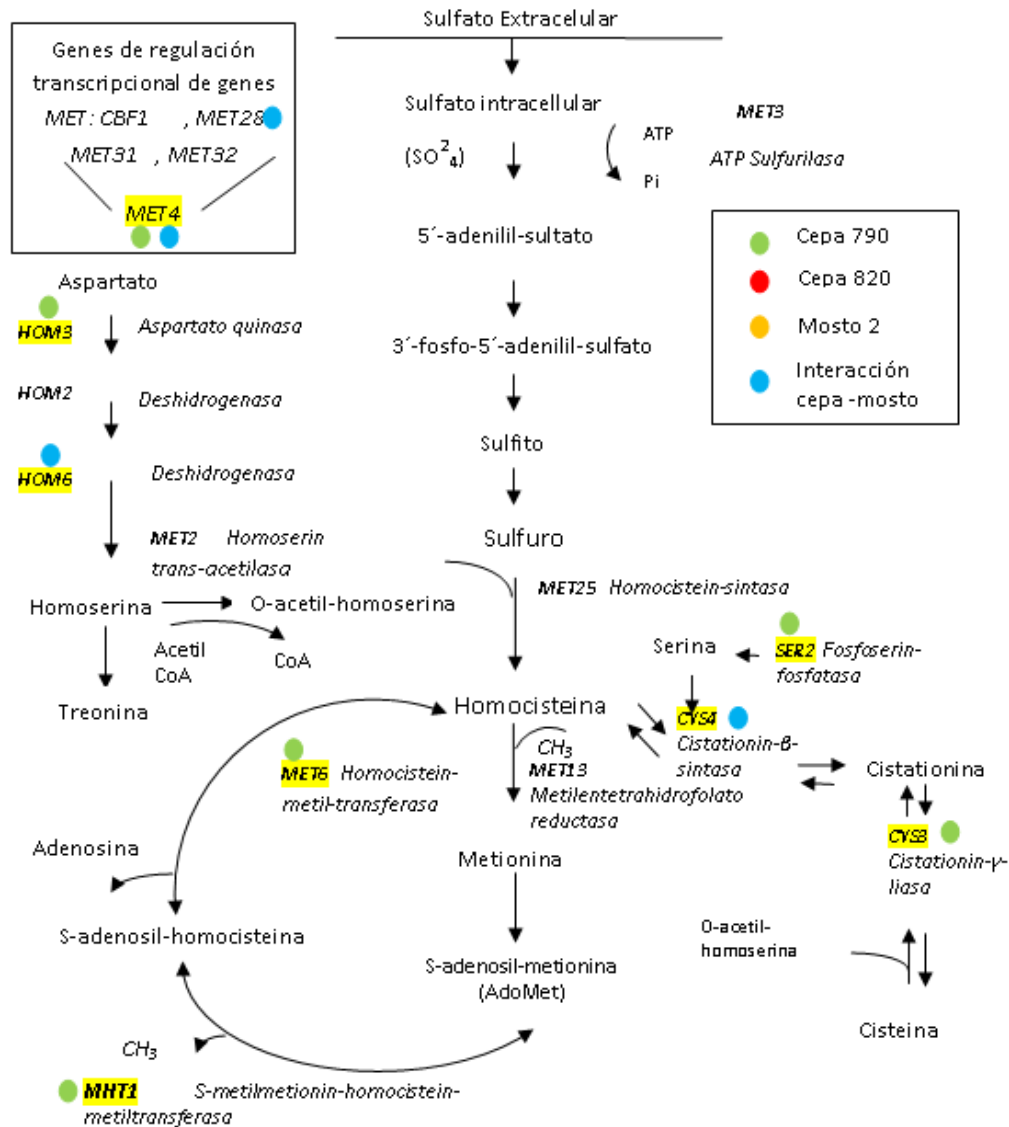


Figura 7. Genes con diferencia significativa ($p<0.05$) en su expresión debido a cepa, mosto e interacción cepa-mosto al día 1 de fermentación

En la figura 8 se presenta la grafica del valor $\Delta\Delta Cp'$, determinando el diferencial de expresión de genes con un valor $p < 0.05$. Se observó que los genes MET6 y MHT1 se sobre expresaron más de 8 veces en la cepa 790 respecto a la 820. De hecho en esta etapa la 820 no expresa más ningún gen con respecto a la otra cepa.

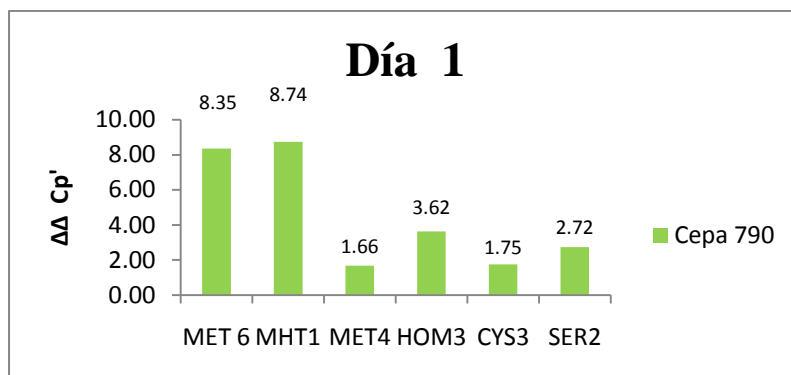


Figura 8. Grafica del valor $\Delta\Delta Cp'$ al día 1 de fermentación

Por otro lado se presentó un efecto significativo de interacción cepa-mosto, observando que las dos cepas se comportan de manera distinta frente a los mostos en ciertos genes. En la figura 9, se muestra en el eje de las X el mosto 2 “M2” y el mosto 1 “M1” y en el eje de las Y la media del valor ΔCp de cada experimento con su réplica biológica, el cual a mayor sea su valor, menor expresión se tiene y viceversa.

La cepa 790 mostro un aumento de expresión en el mosto 1 en los genes MET4, MET28, HOM6 y CYS4. Por el contrario la cepa 820 los expresó más en presencia del Mosto 2. En la figura 7 se visualiza con un punto azul la ubicación de estos genes en la ruta metabólica.

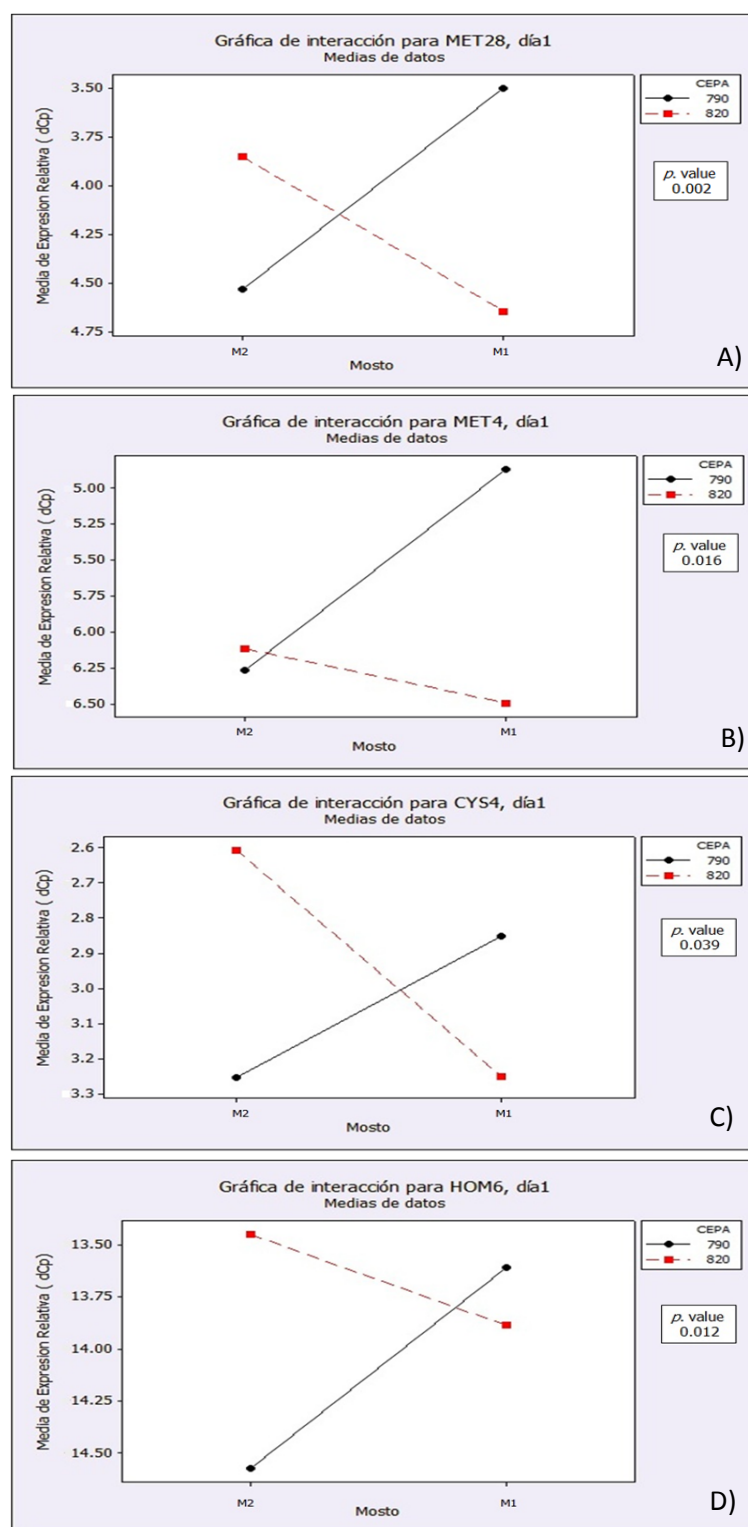


Figura 9. Graficas de interacción cepa-mosto, día 1 de fermentación. A) MET28, B) MET4, C) CYS4, D) HOM6

Día 2 de fermentación

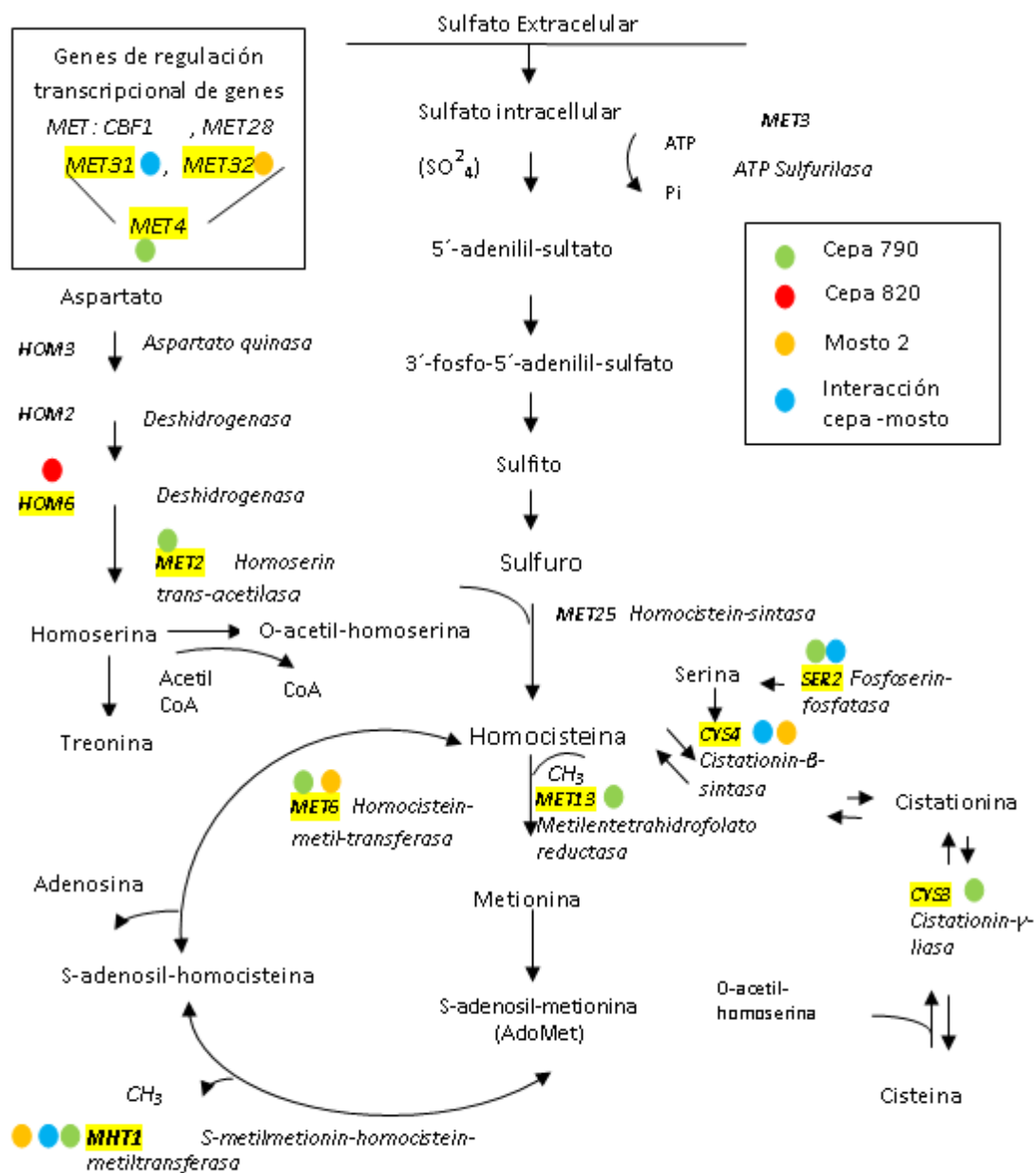


Figura 10. Genes con diferencias significativas ($p < 0.05$) de cepa, mosto e interacción cepa-mosto al día 2 de fermentación

Al día 2 de fermentación se tiene un efecto de cepa, en donde la 790 vuelve a tener mayor expresión de genes con respecto a la 820 la cual solamente expresa más el gen HOM6, y también a diferencia del día 1, se mostró diferencias significativas entre mostos, donde el mosto 2 presenta mayor expresión en ciertos genes con respecto al mosto 1, como se observa en la tabla XVIII y su ubicación en la ruta metabólica de la figura 10.

En la figura 11 se presenta la grafica del valor $\Delta\Delta Cp'$, determinando el diferencial de expresión de genes con un valor $p < 0.05$. La cepa 790 al igual que el día 1 se observó un mayor nivel de expresión en los genes MET6 y MHT1 respecto a 820, la cual, solamente tiene mayor expresión en el gen HOM6. A nivel de mosto, se puede visualizar que tantas veces más se expresa el mosto 2 con respecto al mosto 1.

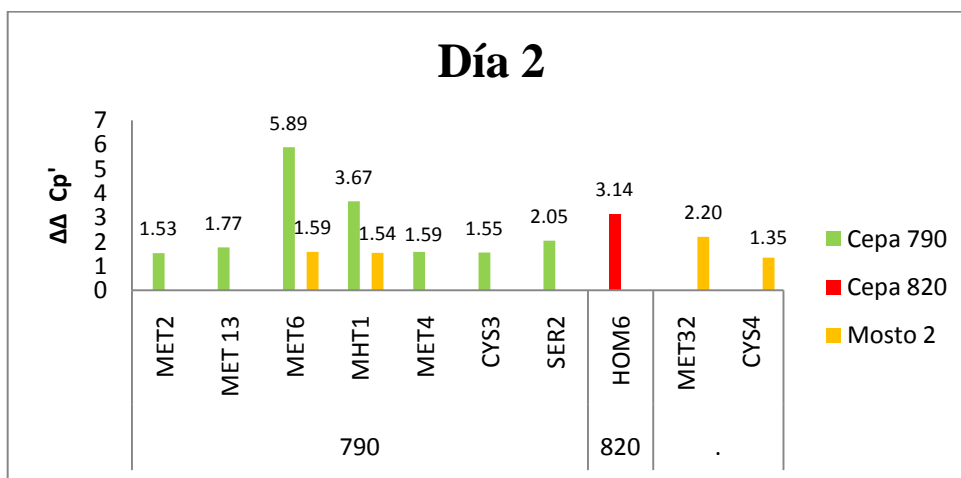


Figura 11. Grafica del valor $\Delta\Delta Cp'$ al día 2 de fermentación

En las graficas de interacción al día 2 (Fig. 12) se observa que la cepa 820, tiene un mayor nivel de expresión cuando está en presencia de Mosto 2 en los genes SER2, CYS4 MHT1 y MET31, mientras que la cepa 790, tiene un ligero aumento de expresión en presencia de mosto 1 para el gen SER2 Y MET31, mientras que CYS4 y MHT1 la expresión es similar en ambos mostos.

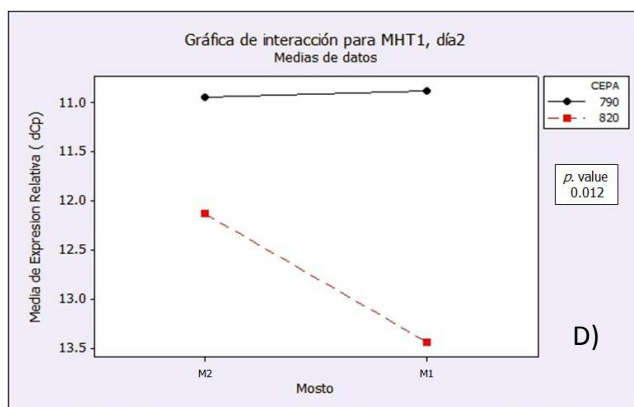
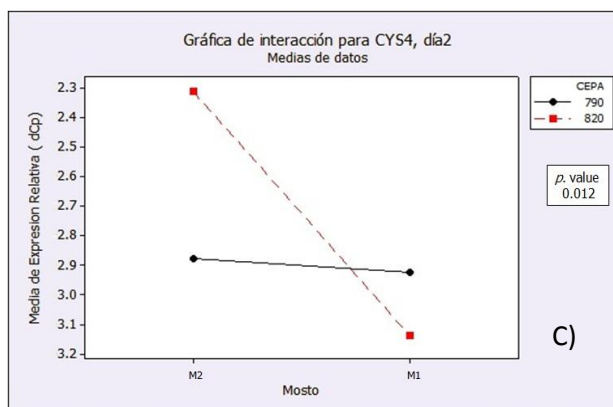
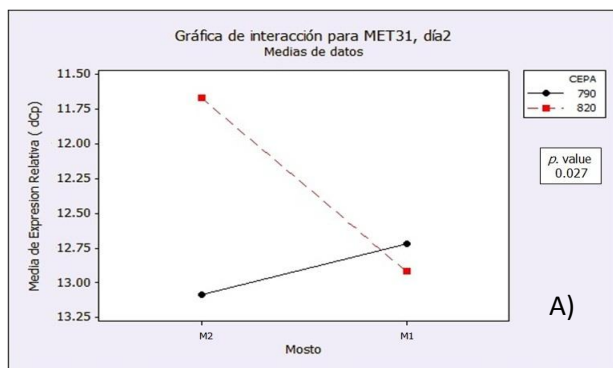


Figura 12. Graficas de interacción cepa-mosto, día 2 de fermentación. a) MET31, b) SER2, c) CYS4, d) MHT1

Día 3 de fermentación

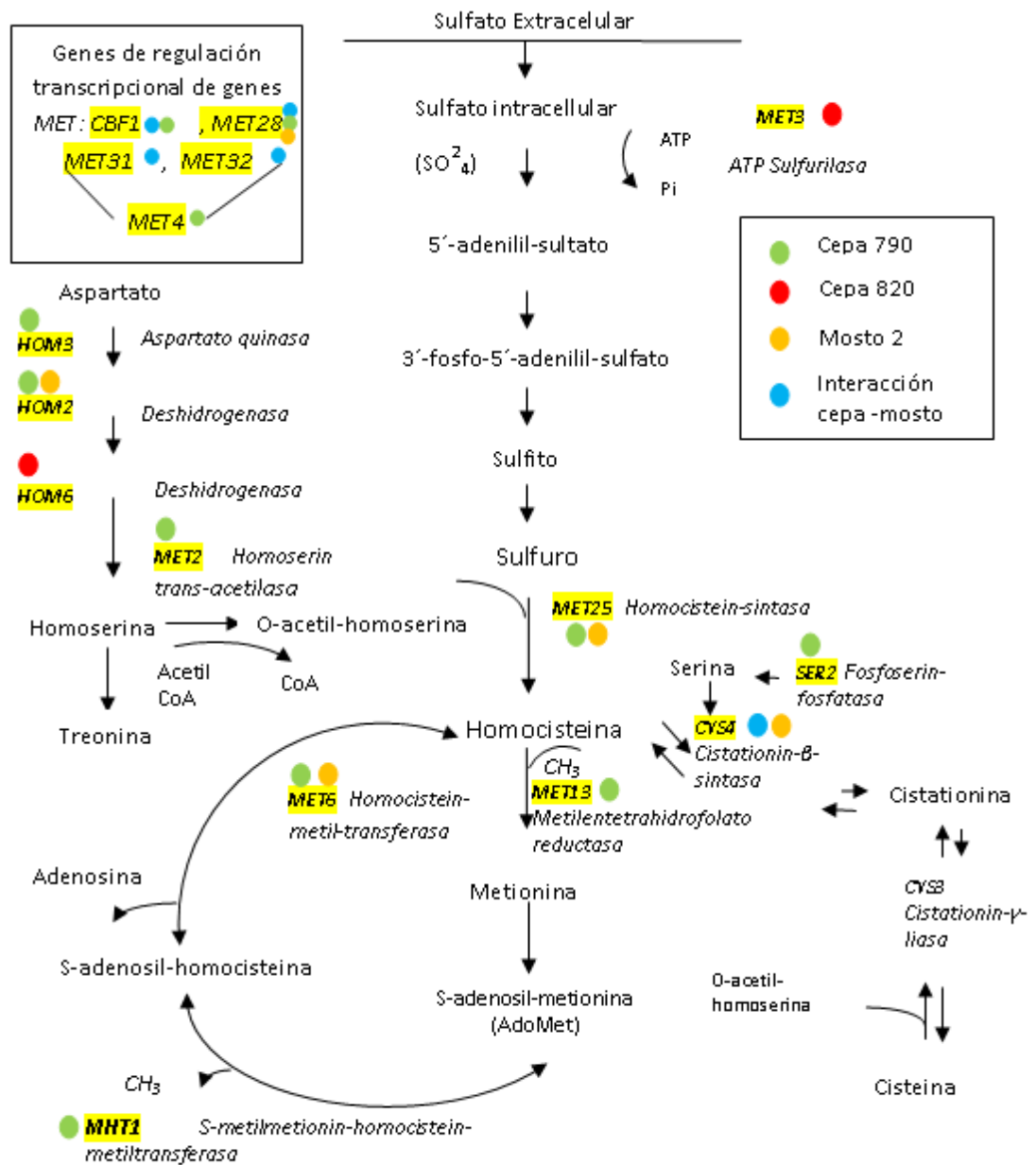


Figura 13. Genes con diferencias significativas ($p < 0.05$) de cepa, mosto e interacción cepa-mosto al día 3 de fermentación.

Al día 3 de fermentación hay un efecto de cepa y mosto (tabla XVIII, figura 13 y 14), en donde la cepa 790 expresa más los genes CBF1, MET28, MET4, HOM3, HOM2, MET2, MET25, SER2, MET6, MET13; MHT1. Por el contrario la cepa 820 expresa más el gen MET3 y HOM6.

El mosto 2 en las dos cepas tiene un mayor nivel de expresión en el gen MET28, HOM2, HOM6, MET25, MET6 y CYS4.

A continuación en la figura 14 se presenta la grafica del valor $\Delta\Delta C_p'$ según sea el caso mencionado anteriormente.

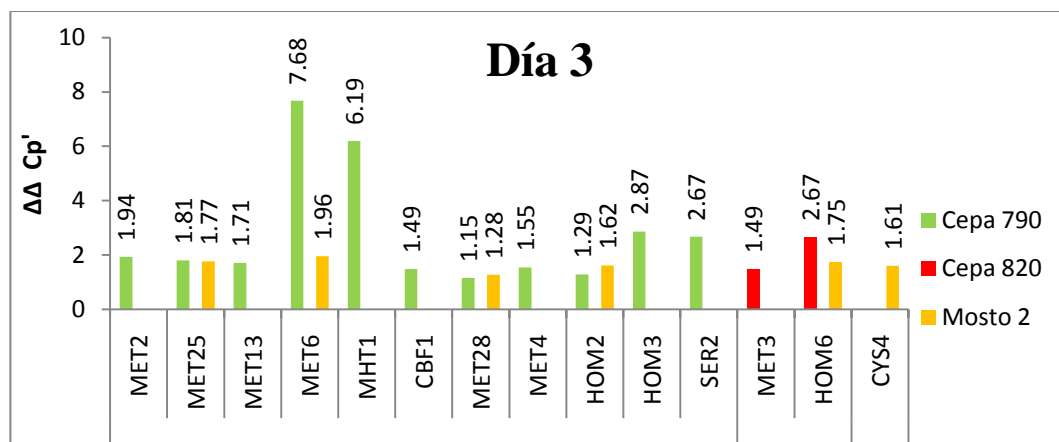
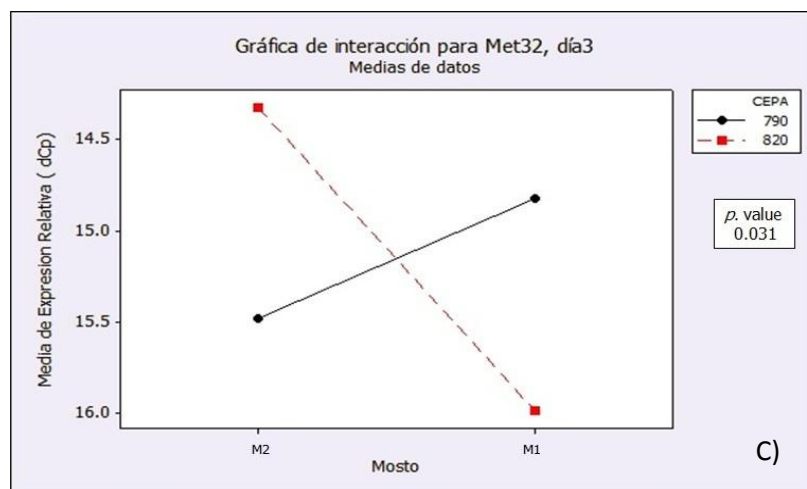
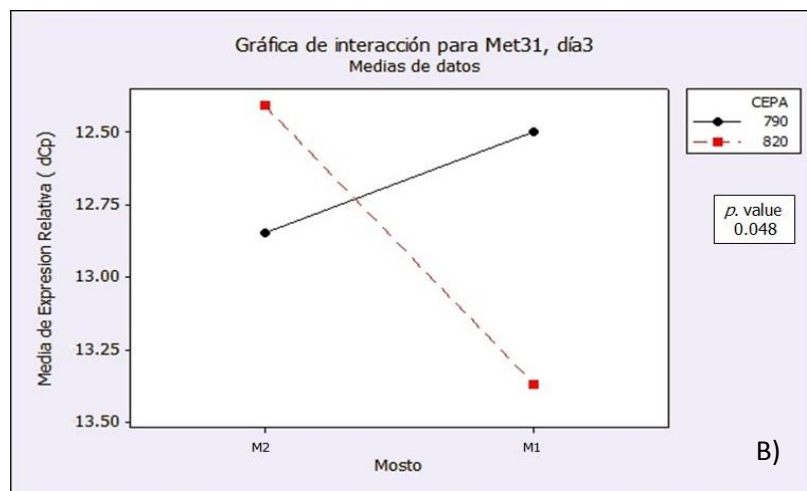
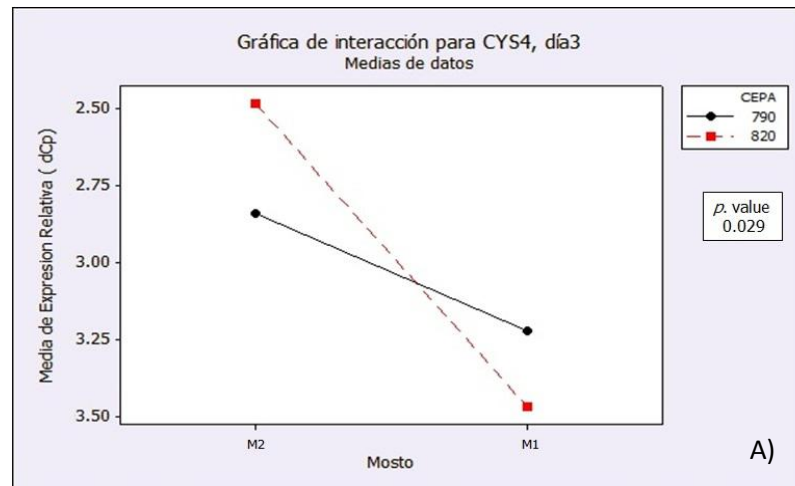


Figura 14. Grafica del valor $\Delta\Delta C_p'$ al día 3 de fermentación

Como diferencia significativa a nivel interacción, la cepa 820 en presencia de Mosto 2 expresa mas los genes: CBF1, MET28, MET31 y MET32. Por el contrario la cepa 790 para el gen CBF1 tiene un ligero aumento en el Mosto 1; MET28 tiene similar expresión en los dos mostos; en MET31 y MET32 los expresa más en presencia de mosto 1. El gen CYS4, las dos cepas lo expresan más en el Mosto 2 pero a diferente nivel, 820 lo expresa más 790 (Fig. 15).



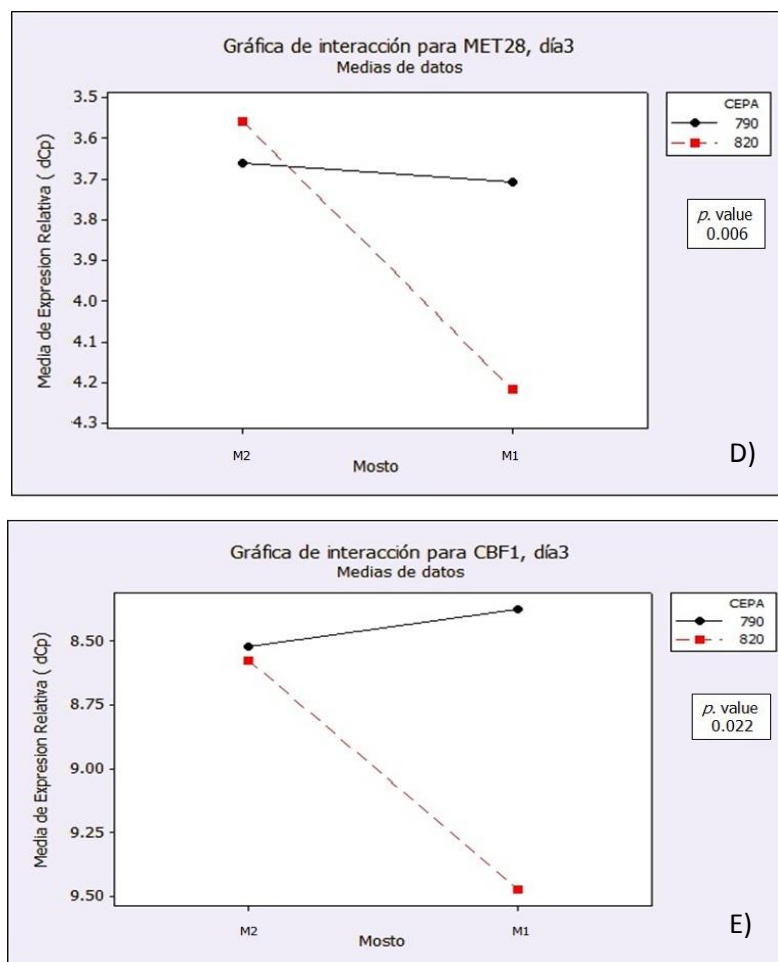


Figura 15. Graficas de interacción cepa-mosto, día 3 de fermentación. a) CYS4, b) MET31, c) MET32, d) MET28, e) CBF1

7.5 Parámetros monitoreados durante las fermentaciones de ensayos de qPCR

7.5.1 Viabilidad celular: La condición de viabilidad de la levadura se mantuvo por arriba 93% estando todos los ensayos dentro del rango aceptable para un buen desempeño de la levadura (Tabla XIX).

Tabla XIX. Porcentaje de células viables, en la levadura de inóculo y en cosecha.

Mosto	Cepa 790		Cepa 820	
	Levadura de inóculo	Levadura de cosecha	Levadura de inóculo	Levadura de cosecha
1	94.35	98.07	95.36	94.78
2		96.38		93.39

7.5.2 Diacetilo al final de la fermentación y siembras microbiológicas: El diacetilo al séptimo día de fermentación oscilo entre 0.22 - 0.43 sin diferencia significativa en los tratamientos. Las siembras microbiológicas generaron resultados negativos en cuanto a contaminación.

7.5.3 Células en suspensión: En las células en suspensión se observa, que la cepa 790 floculó más intensamente que la cepa 820, ya que se reporta una menor cantidad de células en suspensión al final de la fermentación (Tabla XX).

Tabla XX. Células en suspensión al final de la fermentación representada en millones de cel/ml.

790		820	
M1	M2	M1	M2
0.345	0.23	3.215	1.495

8.0 DISCUSIÓN

8.1 Análisis transcripcional por medio de microarreglos

Para evaluar a nivel transcripcional el comportamiento de levaduras cerveceras 790 y 820 frente a la producción de compuestos de azufre, se realizó análisis de microarreglos, evaluando las variables cepa, mosto y viabilidad, en las que de acuerdo con investigaciones pueden afectar la producción de compuestos azufrados en la cerveza terminada (Pickerell, *et al.* 1991; Duan *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos al día 2 de fermentación, indican que las dos cepas sobre expresan el gen **MUP3** que codifica una permeasa de baja afinidad a metionina, probablemente este sobre expresado este gen debido a que aun está presente algo del aminoácido metionina en el medio al segundo día de fermentación ya que se ha determinado que este aminoácido, el cual pertenece al grupo “B” de absorción mediana, es consumido en las primeras 48 h de fermentación (Lekkas C. *et al.*, 2005). Dentro de la principal ruta productora de sulfuro, las dos cepas presentan comportamiento diferente. La cepa 790 sobre expresa el gen **MHT1**, que codifica la enzima AdoMet-homocistein-metiltransferasa, la cual tiene la función de mantener un equilibrio en la relación intracelular entre metionina y su forma activa S-adenosilmetionina, principal donador de grupos metilo en diferentes reacciones de transmetilación. Esto sugiere que esta cepa, tiene la capacidad de convertir con mayor intensidad el subproducto de la transmetilación, el S-adenosilhomocisteina en homocisteina, la cual es remetilada en metionina por medio de otras enzimas que actúan en la ruta de asimilación de sulfatos (Thomas D. *et al.* 2000). Por el contrario la cepa 820 presento un comportamiento diferente en la ruta antes y después de la biosíntesis de homocisteina, dividiendo la ruta en dos partes. En la primera parte, se sobre expresaron **MET3** y **MET2**, generando probablemente, la entrada de sulfato a la célula e introduciendo O-acetilhomoserina para la producción de homocisteina. En la segunda parte varios genes fueron sub expresados (**MET13**, **MET6** y **MHT1**), provocando probablemente la acumulación de H₂S en el medio, ya que al reprimirse estos genes la conversión de la homocisteina en metionina, y este a su vez en S-adenosilmetionina se vería disminuido, alterando el equilibrio homeostático entre estos dos productos.

A nivel de reguladores transcripcionales de genes MET se obtuvo un comportamiento diferente en comparación a los resultados de los análisis en tiempo real, esto se discutirá más adelante en el apartado 8.5

8.2 Fermentaciones para análisis de PCR en tiempo real

Para la elaboración de mostos para fermentaciones de ensayos de PCR en tiempo real se logro obtener exitosamente diferencias significativas en la cantidad de FAN. Cañamar (2007) mencionó que para mostos alrededor de 17°P se necesitan niveles mayores a 131 mg/L de FAN para el desempeño de la levadura, por lo que en este estudio los dos tipos de mostos, tanto en ensayos de microarreglos como en ensayos de qPCR, se ubican en los rangos para obtener una fermentación tipo lager. Por otro lado, dentro de los aminoácidos que mostraron diferencias significativas entre los mostos y que están relacionados a la producción de compuestos de azufre se encuentran serina, ácido aspártico, glicina y treonina. De esta forma se podía esperar alguna afectación en la producción de compuestos azufrados durante la fermentación, ya que Bamforth (2003) reporta una reducción de malta en los formulados para la producción de cerveza provoca perturbaciones en el balance de aminoácidos afectando la generación de compuestos aromáticos.

En la literatura se menciona que al enriquecer mostos con ciertos aminoácidos puede inducirse la formación de compuestos azufrados o bien disminuirlos, sin embargo los resultados suelen ser resultados diversos y en ocasiones contradictorios Tal es el caso de aminoácidos azufrados, en donde la adición de metionina al medio, en algunas cepas disminuye la generación de H₂S mientras que en otras cepas la aumenta, por otro lado la adición de cisteína puede ocasionar un aumento de H₂S (Duan *et al.* 2004; Vermuelen *et al.* 2005). Aminoácidos no azufrados como serina y treonina también juegan un rol en la producción de H₂S. La serina contribuye a la inhibición de la ruta de reducción de sulfato y la treonina aumenta el H₂S, debido a que disminuye la síntesis de homoserina por medio de la retroalimentación de aspartato quinasa, evitando la disponibilidad del esqueleto carbonado para unirse con el sulfuro y formar homocisteína (Vermuelen *et al.* 2005; Boulton & Quain, 2003). En la producción cervecera, llegar a los niveles de aminoácidos adicionados en las investigaciones mencionadas anteriormente, no se logra de manera natural, por lo que no se puede llegar a una conclusión contundente sobre el

efecto en la generación de compuestos azufrados a nivel industrial. En nuestro estudio no se adiciono de manera externa aminoácidos al mosto, sino se agregaron de forma natural por procesos de selección de cebada, condiciones de malteo y parámetros de maceración. De esta forma la serina y treonina fueron los aminoácidos que obtuvieron diferencias significativas entre los mostos y que según las investigaciones anteriormente mencionadas tienen un efecto en la generación de compuestos azufrados. Cabe destacar que en la serina se pudo observar una mayor diferencia entre los mostos (8 veces más en mosto 2 con respecto a mosto 1) en comparación a treonina (1.37 veces más en mosto 2 con respecto a mosto 1). Por lo que es probable que este aminoácido este favoreciendo a una disminución en la producción de H_2S , lo cual se detallara más adelante en los resultados.

En los ensayos de PCR en tiempo real se determino la expresión de los genes seleccionados en los primeros tres días de fermentación (en los cuales se presenta una mayor actividad en la célula ya que a partir del 4to día la levadura empieza a activar su maquinaria de floculación preparándose para pasar al estado de dormancia), y se observaron efectos significativos debido a las cepas, mostos e interacción entre cepa-mosto en ciertos genes durante los tres días de muestreo.

8.2.1 Día 1 de fermentación

Efecto de cepa

En este día se observó un efecto de cepa. 790 presentó una mayor actividad en cuanto a expresión de genes. Esta cepa expresó mas **MET4**, el cual es el “switch” para activar o inhibir los genes MET, probablemente por la posible demanda de S-adenosilmetionina (AdoMet) por la célula, ya que se ha reportado que este es activado cuando la concentración de AdoMet está baja (Blaiseau P., et al., 1997; Blaiseau P.L. y Dominique T., 1998).

Dentro de la ruta metabólica, en esta cepa se tuvo mayor expresión en genes que favorecen a la incorporación del sulfuro hacia la formación de aminoácidos. Por la vía del aspartato se expresó mas **HOM3** el cual codifica para la enzima aspartato quinasa , que cataliza el primer paso en la vía de la biosíntesis de homoserina precursor de metionina. Se a reportado que la expresión de este gen es regulada por el activador transcripcional Gcn4p (bZIP, por sus siglas en ingles “basic leucine zipper”) en

respuesta a la disminución de aminoácidos esenciales como metionina y treonina (Hinnebusch A. & Krishnamurthy N., 2002; Bioquímica, 2003). Por lo que probablemente lo expresó más debido a la demanda de estos aminoácidos al inicio de la fermentación. Por el lado de la biosíntesis de serina se tiene una mayor expresión en **SER2**, el cual codifica la enzima fosfoserina fosfatasa, esta cataliza el último paso para la producción de serina y glicina, estas dos contribuyen en conjunto a rutas de biosíntesis que se denominan metabolismo de un carbono. La cepa 790 probablemente favorece por medio de este gen la entrada de serina a la ruta lo que ocasiona la desviación de la homocisteína hacia la transulfuración para la formación de cisteína. En la literatura se menciona que este gen es regulado por el activador transcripcional Gcn4p de forma similar a HOM3, en donde se ha demostrado que juega un vital rol en la biosíntesis de serina en la creciente demanda durante la adaptación a la anaerobiosis. Este aumento de expresión también se puede deber a las necesidades de serina para la remodelación anaeróbica de la pared celular, con la participación de síntesis de novo de un gran número de manoproteínas ricas en serina y un incremento en el total de serina de la pared celular (Tsoi B., *et al.*, 2009; McKee T. & James M, 2003)

Dentro de la vía de transulfuración para la formación de cisteína se expresó más **CYS3** el cual codifica para la enzima cistationina γ liasa, esta rompe la molécula de cistationina para generar cisteína (Thomas D., Surdin-Kerjan Y., 1997). De acuerdo a Hiraishi H, *et al.* (2008), este gen es regulado por la cantidad de cisteína en la célula y por ende cuando hay niveles bajos de esta, puede activar complejos de regulación transcripcional similares a los genes de la vía de asimilación de sulfato MET4-CBF1 unidos al “motif” CDE1 (por sus nombre en inglés “centromere DNA element 1”).

Siguiendo con la ruta metabólica, en la parte de biosíntesis de metionina, en la cepa 790 probablemente se esté favoreciendo la incorporación de homocisteína en metionina, ya que se expresó más el gen **MET6**, el cual codifica la enzima homocistein-metiltransferasa; esta enzima transfiere un grupo metilo para formar metionina (Thomas D., Surdin-Kerjan Y., 1997); por otro lado al término de la biosíntesis de AdeMet, la cepa expresa más el gen **MHT1** favoreciendo el mecanismo de regulación de la cantidad de S-adenosilmetionina y metionina. Este gen es regulado de forma similar a los genes MET, y es reprimido en presencia de altas concentraciones de metionina (Thomas D., *et*

al., 2000). Estos dos últimos genes mencionados tienen un mayor nivel de expresión en comparación con los demás genes donde se obtuvo efecto, sugiriendo que la cepa 790 tiende a formar metionina y S-adenosilmetionina en equilibrio.

Efecto de interacción cepa-mosto

Para saber si el tipo de mosto influye en la expresión de los genes en estudio en las dos cepas, con el análisis factorial se pudo determinar el efecto de interacción cepa-mosto.

La cepa 820 en presencia de mosto 2 mantiene más expresado ciertos genes a nivel de regulación transcripcional de genes MET los cuales son **MET4** (el cual es el activador transcripcional de genes MET) y **MET28** (miembro de la familia “Basic leucine zipper” por sus siglas en ingles bZIP, regula la formación del complejo heteromérico Cbf1p-Met4p-Met28p-Met31p-Met32p, para la activación de genes MET mediante la inducción del gen CBF1). También se favorece la expresión de genes que ayudan a incorporar el sulfuro para la formación de aminoácidos. Dentro de la ruta por la vía del aspartato, el gen **HOM6** el cual codifica para la enzima homoserina deshidrogenasa, cataliza el último paso para la transformación de aspartato en homoserina, y su posterior transformación a homocisteína y por la vía de transulfuración para la formación de cisteína se tiene al gen **CYS4**, este codifica para la enzima cistationina β sintasa. Hasta el momento este último gen no se le ha descubierto algún activador a nivel transcripcional del gen, sin embargo, se ha sugerido que la serina actúa como un controlador de la síntesis de AdoMet y producción de H_2S , limitando la cantidad de homocisteína por medio de la transulfuración. Este proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: la serina se condensa con la homocisteína en una reacción catalizada por cistationina β sintasa, y de esta forma se evita una hiperacumulación de AdoMet y la excreción de H_2S al medio (Chan S. & Dean R., 2003; Wilson E y Jan K., 2004). Por otro lado Linderholm A. y colaboradores (2008), reportaron que una sobreexpresión de este gen puede generar una reducción de H_2S en cepas cerveceras. Por el contrario la cepa 790 estos genes mencionados los expresa mas en presencia de mostos bajos en nutrientes (mosto 1)

8.2.2 Día 2 de fermentación

Efecto de cepa

La expresión de la cepa 790 a nivel de regulación transcripcional sigue el mismo patrón que el día 1. Expreso más **MET4**, lo que nos sugiere que tiene más activa la maquinaria de asimilación de sulfatos. Por otro lado por la vía del aspartato, expreso más **MET2**, que codifica para la enzima homoserina trans-acetilasa. Se ha reportado que un prerrequisito para la biosíntesis de homocisteína es la activación de homoserina a través de esterificación, esta enzima cataliza la reacción en la que una molécula de acetil coenzima A es consumida, por lo que al tener más activo este gen, probablemente se esté incorporando constantemente el esqueleto carbonado para la incorporación del sulfuro a la ruta (Thomas D., Surdin-Kerjan Y., 1997).

Por la vía de transulfuración, a nivel de la síntesis de serina y su incorporación para la síntesis de cisteína tiene un patrón similar al día 1 ya que expresa más los genes **SER2** y **CYS3**.

Siguiendo con la ruta a nivel de biosíntesis de metionina, se expresa mas **MET6** y **MET13** este ultimo codifica para la enzima tetrahydrofolato reductasa, que cataliza la formación de un donador de grupos metilo, 5-metiltetrahydrofolato, originado del metabolismo de un carbono, en la reducción de 5,10-metilenetetrahydrofolato a 5-metilenetetrahydrofolato, en la que el grupo metilo se transfiere a la homocisteína por medio de la enzima que codifica el gen MET6 para la formación de metionina (Thomas D., Surdin-Kerjan Y., 1997; Shan X., et al., 1999). Por último expreso mas **MHT1**, manteniendo un probable equilibrio AdoMet/Metionina, similar a los resultados obtenidos en los ensayos de microarreglos. De igual forma que el día 1 MET6 y MHT1 tienen un mayor nivel de expresión en comparación con los demás genes donde también se obtuvo diferencia significativa.

En contraste, la cepa 820 solamente expresa más en comparación a 790, por la vía del aspartato, el gen **HOM6**, por lo que se sugiere que está favoreciendo la incorporación del esqueleto carbonado para la formación de homocisteína únicamente manteniendo sin efecto el resto de los genes.

Efecto de mosto

En este día se obtuvo un efecto de mosto como se observa en los resultados, en donde en presencia de Mosto 2, a nivel transcripcional se expreso mas **MET32**, el cual codifica para una pequeña proteína llamada “zinc finger-containing proteins” que es un factor transcripcional que actúa en trans sobre la región “upsetram” del gen MET28 para su expresión. Esto varia dentro de la familia MET, ya que para unir Met4p al ADN depende de la región promotora, en algunos genes se requiere la unión de Cbf1p-Met28p. En otros casos se requiere la unión de Met31p ó Met32p con Met28p. Este gen se ha visto que regula genes de la ruta de asimilación de sulfato como MET3 y MET14, al igual que permeasas de metionina (Blaiseau P & D. Thomas, 1998; Thomas D. & Surdin-Kerjan Y., 1997). Dentro de la ruta metabólica se expreso mas **CYS4**, **MET6** y **MHT1**, por lo que se sugiere que al haber un aumento de serina en el mosto 2 según el perfil de aminoácidos, es probable que se esté favoreciendo a que no haya un aumento innecesario de AdoMet, desviando la homocisteina hacia la transulfuración; y por la vía de asimilación de sulfatos se incorpora la homocisteina en metionina, manteniendo por ultimo un equilibrio por medio de la remetilación favorecida por MHT1.

Efecto de interacción cepa-mosto

La cepa 820 en presencia de mosto 2 similar al día 1, activo más la expresión por la vía de transulfuración teniendo los genes **SER2** y **CYS4**, y por la vía de biosíntesis de AdoMet, **MHT1** involucrado en la remetilación, favoreciendo probablemente a que no haya un acumulo de H₂S intracelular y este sea excretado al medio. Se expreso más el regulador transcripcional **MET31**, el cual tiene la misma función que el gen MET32 mencionado anteriormente. Por el contrario la cepa 790, **SER2** se expreso mas en presencia de Mosto 1, sugiriendo que esta cepa en mostos bajos en compuestos nitrogenados sintetiza mayor cantidad de serina y desvía el H₂S a la formación de cisteina, por otro lado el gen **CYS4** y **MHT1** la expresión es similar en ambos mostos, teniendo la cepa una posible adaptación para estar generando cisteina y al mismo tiempo estar manteniendo un equilibrio en la producción de AdoMet/metionina independientemente del mosto. A nivel de regulación transcripcional de genes MET, **MET31**, se expreso más en presencia de Mosto 1, sugiriendo que ambas cepas regulan este factor transcripcional dependiendo del contenido de compuestos nitrogenados. Estos

resultados sugieren que la cepa 820 en mostos ricos en nutrientes nitrogenados presentes en el Mosto 2 es capaz de activar genes que facilitan la incorporación del sulfuro a cadenas de carbono para su transformación y de esta forma evitar el acumulo del mismo. En cambio la cepa 790 es capaz de adaptarse al mosto evitando el acumulo de sulfuro por medio de la vía de transulfuración y remetilación.

8.2.3 Día 3 de fermentación

Efecto de cepa

Al día 3 de fermentación se volvió a presentar un efecto por la cepa, en donde 790 tuvo una mayor actividad de expresión en comparación a la cepa 820. Expreso mas a nivel de regulación transcripcional el complejo heteromeric formado por **CBF1** (que codifica la proteína “Helix-loop-helix” que se une al “motif” CACRTG, que está presente en varios sitios incluyendo los promotores de genes **MET** y el elemento de ADN centrómero I (CDEI)), **MET28** y **MET4** (Thomas D., Surdin-Kerjan Y., 1997; Wieland G. et al., 2001), teniendo de esta forma una mayor probabilidad de activar la maquinaria de ciertos genes **MET**.

Dentro de la ruta expreso mas genes que se encuentran debajo del sulfuro en la ruta metabólica de asimilación de sulfatos, en donde por la vía del aspartato se tuvo **HOM3**, **HOM2** (el cual codifica para la enzima Aspartico beta semi-aldehido deshidrogenasa), la expresión de estos dos genes es requerida para la síntesis de homoserina, posteriormente, siguiendo esta ruta se expreso mas **MET2**, así por medio de estos tres genes mencionados, se estaría introduciendo con mayor facilidad O-acetilhomoserina. Dentro de la ruta de asimilación de sulfatos por la vía de incorporación del sulfuro para formación de homocisteina, el gen **MET25** de igual forma lo sobreexpreso, este ultimo incorpora el sulfuro junto con O-acetilhomoserina para formar homocisteina (Linderholm A., et al., 2008), por otro lado para la síntesis de serina se sobreexpreso **SER2**, y por la vía de síntesis de metionina y la remetilación de S-adenosil metionina se tienen los genes **MET6**, **MET13** y **MHT1**. Con estos genes probablemente se está direccionando el sulfuro a la producción de metionina y a su vez en su forma activa S-adenosilmetionina evitando una sobreproducción de ambos o bien a la transulfuración para producción de cisteina.

Por el contrario la cepa 820 expreso mas el gen **MET3**, este codifica para la enzima ATP sulfurilasa, la cual cataliza el primer paso para la activación de sulfato intracelular (Ullrich T, *et al.*, 2001), seguido por la vía del aspartato obtuvo efecto en **HOM6** el cual codifica el último paso para la síntesis de homoserina como se menciono anteriormente. Esto sugiere que la cepa 820 introduce en mayor cantidad sulfato a la ruta, y a la vez introduce el esqueleto carbonado para la síntesis de homocisteina, pero no hay ningún efecto en los demás genes que puedan favorecer a que no se acumule H₂S.

Efecto de mosto

El Mosto 2 favoreció la sobreexpresión de ciertos genes en ambas cepas, que están por debajo del sulfuro en la ruta metabólica similar al día 2, en donde primeramente a nivel de reguladores transcripcionales de genes MET se tuvo mayor expresión en **MET28** por lo que se pudiera considerar que este gen este estimulando la unión de MET4 al gen CBF1 para activar la ruta metabólica. Por otro lado en la vía del aspartato para la síntesis de homoserina se expreso más **HOM2** y **HOM6**, se ha reportado que una incapacidad de producir este compuesto puede generar un aumento de sulfuro (Linderholm A., *et al.*, 2008). En la vía de incorporación de sulfuro para la síntesis de homocisteina, se observó un aumento de expresión en **MET25**, seguido de **CYS4** por la vía de transulfuración y **MET6** para la síntesis de metiona. Esto sugiere que las dos cepas en presencia de mostos ricos en compuestos nitrogenados (mosto 2) tienen la capacidad de incorporar con mayor facilidad el sulfuro hacia la formación de aminoácidos azufrados. Investigaciones previas mencionan que MET25 y CYS4 ambos controlan la fuga de sulfuro hacia el medio. Sin embargo esto depende de cepa (Laundaud *et al.* 2008)

Efecto de interacción cepa-mosto

Como efecto de interacción al día 3, se observó un aumento de expresión en genes de regulación transcripcional, en donde la cepa 820 favoreció su expresión en presencia de mosto 2, teniendo mayor expresión en genes que actúan como factores de transcripción para activar al gen MET4 (**CBF1**, **MET28**, **MET31** y **MET32**) por lo que probablemente se esté manteniendo activa la expresión de ciertos genes MET. Por el contrario la cepa 790 para **CBF1** tiene un ligero aumento en el Mosto 1; MET28 tiene

similar expresión en los dos mostos; en MET31 y MET32 los sobreexpresa en presencia de mosto 1. Este resultado sugiere que la cepa 820 en presencia de mosto 2 puede estar metabolizando el sulfuro que se esté aun generando y la cepa 790 al parecer estimula de igual forma en los dos mostos MET4 por medio del gen **MET28**, mientras que los demás genes se expresan más en presencia de mosto 1 (**CBF1**, **MET31** y **MET32**), por lo que de forma similar a los demás días probablemente sea capaz de compensar la baja cantidad de nutrientes nitrogenados manteniendo activa la maquinaria de genes MET.

Dentro de la ruta metabólica el único gen que tuvo efecto por interacción es **CYS4**, como se observa en los resultados, las dos cepas lo expresan más en el Mosto 2 pero a diferente nivel, la cepa 820 lo expreso más que la cepa 790. Estos resultados sugieren que al día 3 las dos cepas al estar presente en mosto 2 tienen la capacidad de estar desviando el sulfuro hacia la transulfuración disminuyendo de esta forma que se acumule H₂S a nivel extracelular.

8.4 Resultados analíticos-sensoriales.

Este estudio fue realizado por Pérez (2010) a la par con el presente trabajo, evaluando analítica y sensorialmente la cerveza, en donde menciona que el factor principal de mayor impacto para la generación de compuestos de azufre fue la cepa, además de ser significativa la interacción entre la cepa y el mosto. A nivel analítico determinó la concentración de H₂S y MetSAc (metiltioacetato) al final de la fermentación y al tercer día de reposo. El MetSAc al parecer se forma en tándem partiendo de H₂S, CH₃SH (Casey, 2007), o bien por medio de la ruta catabólica de metionina en donde se da una demetilación directamente de metionina generando MetSAc (Perpète et al. 2006). En la figura 16 se aprecia el comportamiento entre las cepas, en donde para la producción de H₂S no son tan evidentes las diferencias para ambas cepas aunque si existen diferencias estadísticas, sin embargo en la producción de MetSAc se marca la diferencia entre las cepas claramente teniendo efecto significativo de cepa, mosto e interacción cepa- mosto, observando que la cepa 820 en presencia de mosto 1 generó mayor concentración de MetSAc.

Por otro lado Pérez (2010) realizó un análisis sensorial. En la figura 17 se aprecian los cuasi-intervalos de confianza en donde catadores especializados

demostraron tener mayor habilidad para detectar aromas azufrados en la muestra de M1 820 (mosto 1 cepa 820) y cuando esta cepa esta en presencia de mosto 2 rico en compuestos nitrogenados, los catadores no son capaces de detectarlo con facilidad, teniendo una coherencia con los resultados obtenidos genéticamente en el presente trabajo de investigación, donde la cepa 820 tiene comportamiento distinto dependiendo del mosto a fermentar.

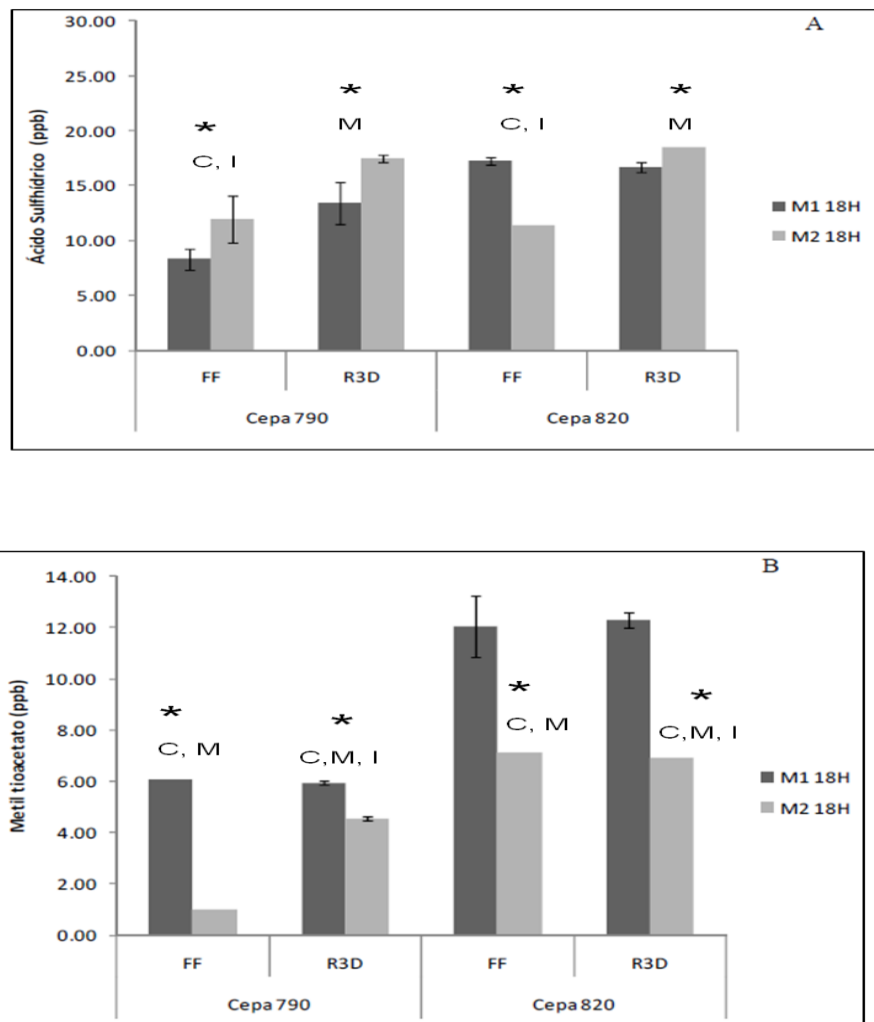
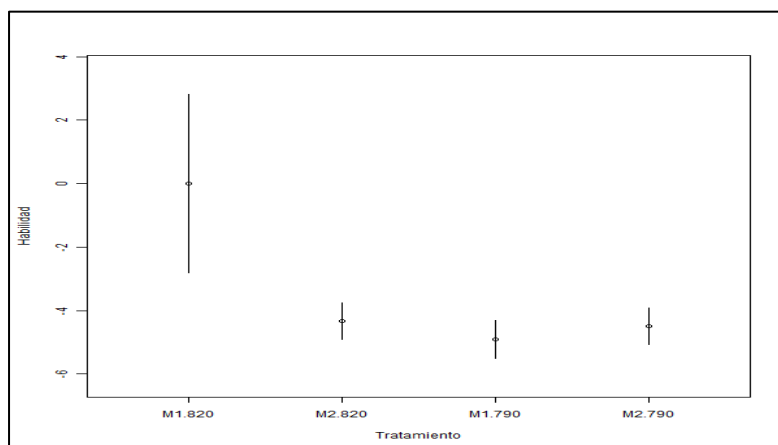


Figura 16. Concentraciones de H₂S (A) y MetSAC (B) al Final de fermentación (FF) y tercer día de reposo (R3D) para ambas cepas, M1 18H (mosto 1 viabilidad 18°C-18H), M2 18H (mosto 2 viabilidad 18°C-18H). Diferencias significativas con $p < 0.05$ (*): “C” cepa, “M” mosto e “I” interacción cepa-mosto (Pérez, 2010)

A)



B)

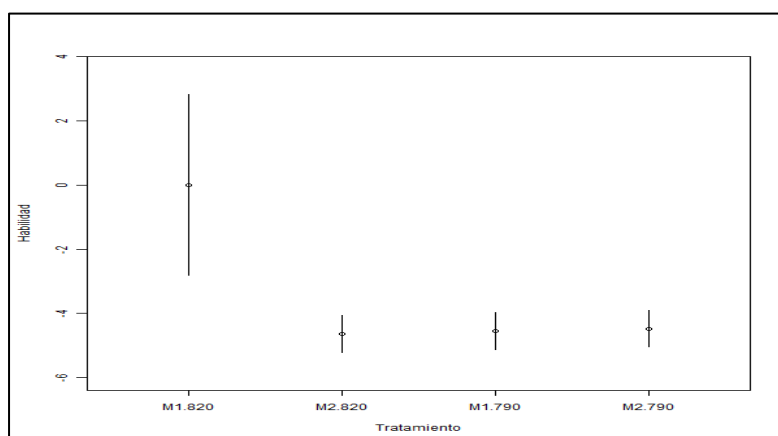


Figura 17. Habilidad de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos en FF (A) y R3D (B). (Pérez, 2010)

8.5 Contraste de resultados de microarreglos y qPCR.

En las fermentaciones para ensayos de qPCR no se tomo en cuenta la variable viabilidad, ya que en el caso de los microarreglos para generar una viabilidad alta y baja, se mantuvieron dentro del estándar, arriba del 90% de células viables al final de fermentación. En la literatura las condiciones para generar compuestos de azufre por medio de la viabilidad de la levadura son más agresivas teniendo la levadura a 25°C por 24 h (Pickerell, et al. 1991), por lo que probablemente en nuestro ensayo resulte una variable de menor impacto, siendo la cepa y el mosto las variables clave.

Por otro lado en cuanto a los genes de regulación transcripcional de genes MET al segundo día de fermentación, se tienen resultados contrastantes con respecto a lo obtenido en qPCR. La cepa 820 en ensayos de microarreglos reprime CBF1, MET 28, MET31, mientras que sobre expresa MET32. En los análisis de qPCR ninguno de estos genes generó diferencias significativas que marcaran alguna alteración en la expresión.

8.6 Regulación genética de compuestos de azufre

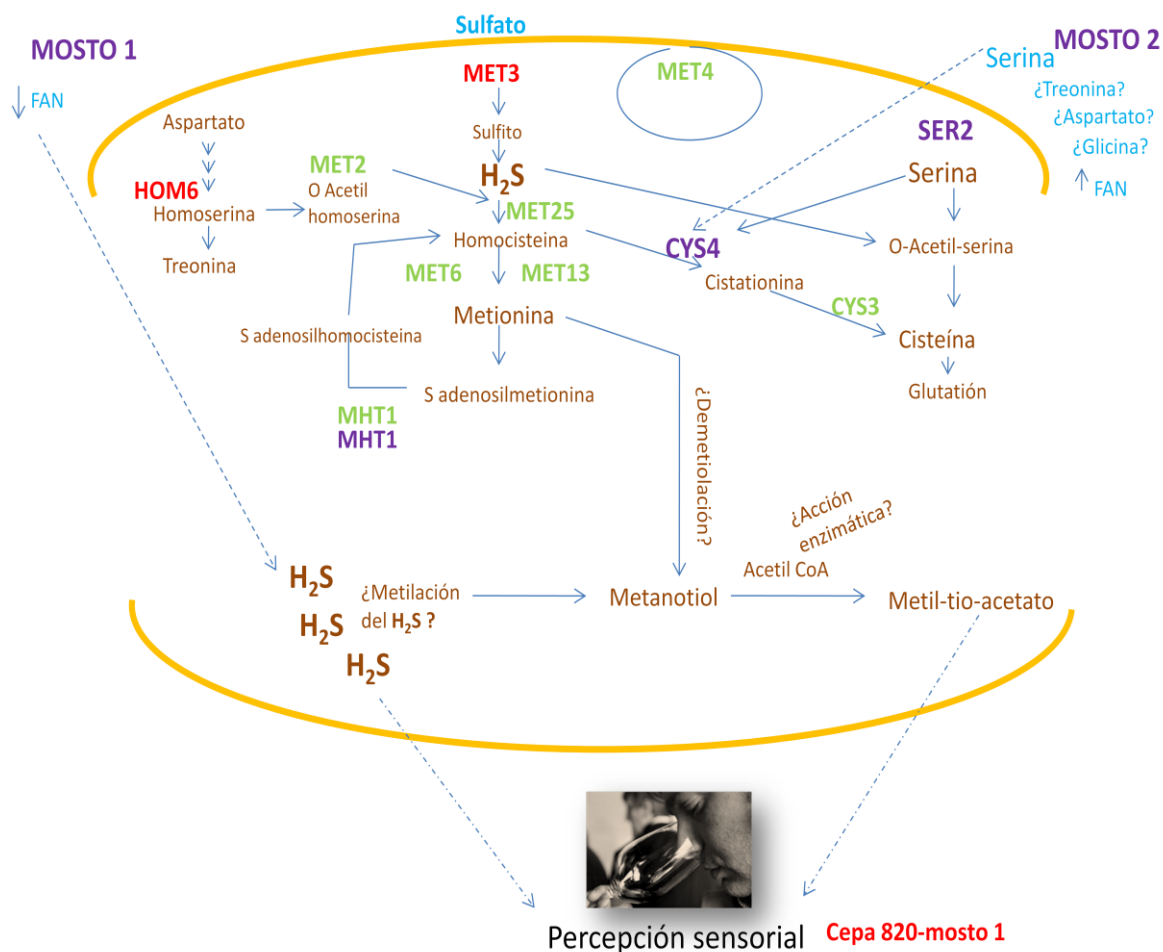


Figura 18. Modelo de regulación de la síntesis de compuestos azufrados en la cepa 790 y 820 y su interacción con el mosto.

Tomando juntas todas las piezas de información obtenidas en los resultados surgió la imagen representada en la figura 18. La cepa 820 introduce mayor cantidad de sulfato a

la ruta e introduce esqueleto carbonado para la formación de homocisteína (genes MET3 y HOM6 en color rojo), sin ser capaz de sobre expresar genes que eviten la acumulación de H₂S. Esto se ve favorecido en presencia de Mosto 1 donde probablemente al tener menor nivel de FAN, insuficientes precursores de metionina y cisteína (O-acetil serina y O-acetil homoserina) estuvieron disponibles y el H₂S libre se acumulo en la célula y se libero al medio.

Por el contrario 790 sobre expresa genes que facilitan la incorporación del H₂S para la formación de aminoácidos (genes en color verde: MET2, MET25, MET6, MET13, MHT1, CYS3, MET4). Esto sugiere que 790, tiene la capacidad de ajustar su maquinaria de expresión genética para evitar un acumulo de H₂S en mostos con distintos niveles de nutrientes nitrogenados.

Sin embargo al hablar de interacción cepa-mosto, 820 en presencia de Mosto 2 sobre expresa la vía de transulfuración y la vía de remetilación (genes en color morado: CYS4, SER2 y MHT1), predominando en los tres primeros días de fermentación el gen CYS4, siendo este una posible clave que puede estar ayudando a que no haya un acumulo de H₂S en el medio. Como ya se menciono anteriormente aun no se conoce ha detalle quien lo regula directamente a nivel transcripcional, sin embargo el aminoácido serina es de vital importancia para que este gen este desviando la vía hacia la transulfuración y como se puede observar, el aminoácido que predomino con respecto a los demás en el Mosto 2 fue serina. Esto concuerda a los resultados obtenidos en los ensayos de Linderholm y colaboradores (2008). Por el contrario 790 la expresión de estos genes es similar en ambos mostos.

A nivel de ensayos analíticos, la cepa 820 en presencia de mosto 1, presento mayor nivel de Metil-tio-acetato, generándose probablemente de distintas vías, por medio de la demetilación de metionina ó metilación del H₂S para formar metanotiol y por medio de una posible acción enzimática se de la formación de Metil-tio-acetato, siendo perceptible con mayor facilidad por los catadores.

Este estudio sugiere que a nivel de producción industrial, la cepa 820 tendrá un mejor desempeño si se fermenta en mostos ricos en serina y la cepa 790 se puede utilizar en mostos bajos en serina con el fin de optimizar costos.

9.0 CONCLUSIONES

- La generación de compuestos de azufre es dependiente de cepa y de la interacción que pueda tener con los nutrientes nitrogenados presentes en mostos a seleccionar.
- De las dos cepas evaluadas, la cepa 820 es altamente productora de compuestos azufrados en presencia de mostos con bajo nivel de compuestos nitrogenados,
- . La cepa 820 al fermentar en Mosto 1 no es capaz de sobre expresar genes que eviten la acumulación de H_2S , generando altas concentraciones de Metil-tioacetato siendo perceptible por los catadores.
- La cepa 820 en presencia de Mosto 2 es capaz de activar su maquinaria genética predominando la vía de transulfuración desviando probablemente la ruta por medio de la participación del aminoácido serina y el gen CYS4.
- La cepa 790 es capaz de favorecer la expresión de genes relacionados a la incorporación del sulfuro hacia la transulfuración o bien hacia la remetilación ya sea en mosto 1 compensando la disminución de compuestos nitrogenados ó bien fermentar en mosto 2 sin tener afectación en el resultado de generación de compuestos de azufre perceptibles por el catador.
- En ensayos de qPCR se logró observar un comportamiento similar a los obtenidos por microarreglos en cuanto a comportamiento entre cepas bajo mostos 1, generando resultados coherentes entre los dos ensayos.

10.0 FUTURAS INVESTIGACIONES

Realizar investigaciones en el área de ingeniería genética, haciendo mutantes “knock out” del gen CYS4 con el fin de poder ampliar el panorama de los genes involucrados en la generación de compuestos de azufre.

Determinar por medio de fermentaciones añadiendo serina y otros aminoácidos al mosto, el comportamiento genético de las cepas, y ver el perfil de los compuestos azufrados generados analítica y sensorialmente, con el fin de determinar cuál es el nivel óptimo de este aminoácido para que no se generen estos compuestos aromáticos.

APENDICES

APENDICE A

Vitalidad de la Levadura por Medio de Microcultivo

Reactivos:

- Solución salina estéril
- Placas con agar YPD: 10g/L de extracto de levadura, 20g/L de peptona, 20g/L de glucosa y 20g/L de agar

Materiales y equipo:

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Placas petri
- Cuchillo
- Etanol
- Microscopio con objetivo de 40X
- Tubos de ensaye de 16 x 125
- Pipetas serológicas de 1 ml

Procedimiento:

Se ajusta una suspensión de células a 500 cel/ml. En una caja petri se coloca un portaobjetos, se corta agar en cuadritos por medio de un cuchillo flameado con etanol, y se colocan dos cuadros de agar YPD, en cada cuadro se coloca de 1 a 2 gotas de la suspensión de células, por último se cubre con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas, se tapa la caja petri y se deja incubando por 16 h a 30°C. Transcurrido el tiempo se observan las microcolonias con el objetivo de 40 X, se cuentan como células viables aquellas que forman la microcolonia por arriba de 10 células y como no viables ó muertas aquellas que están por debajo de las 10 células. Con la ayuda de contadores de células se deben de contar las 500 células totales contando viables y no viables.

Cálculo:

% de células muertas= [células muertas / total de células (viables y no viables)] x 100

APENDICE B

Amino Nitrógeno Libre (FAN) en el Mosto

Reactivos:

- Reactivo colorido de ninhidrina: se disuelve 7.4866 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.0 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de ninhidrina (Baker 4862) y 0.3 g de fructosa en agua destilada y diluir a 100 ml y se ajusta el pH entre 6.6 – 6.8. Una vez realizados e almacena en refrigeración y protegido de la luz por 2 semanas.
- Solución de dilución: disolver 2 g de KIO_3 en 600 ml de agua destilada y agregar 400 ml de etanol al 96%.
- Solución stock de glicina estándar: Disolver 107.2 mg de glicina (Baker M799) en agua destilada y diluir a 100 ml, el reactivo es estable por un mes a 0°C.
- Solución estándar de glicina: este reactivo se prepara cada vez que se va a utilizar y se diluye 1 ml de stock de glicina a 100^o ml con agua destilada, este estándar contiene 2 mg de amino nitrógeno /1.

Materiales y equipos:

- Pipetas volumétricas de 1, 2 y 5 ml
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca
- Matrices de aforación de 100 ml
- Baño de agua hirviendo
- Baño de agua a 20 °C
- Papel filtro Reeve Angel 202
- Espectrofotómetro UV-VIS marca Beckman Coulter Modelo DV-650

Procedimiento:

Para estándar de calibración se prepara el estándar transfiriendo 2 ml de la solución estándar de glicina a tubos de prueba por triplicado.

La preparación de la muestra se hace agitando la muestra homogéneamente, atemperando de 5 a 8 °C y se filtra con papel Reeve Angel. Diluir 1 ml del filtrado a 100 ml con agua destilada y transferir 2 ml del mosto diluido al tubo de prueba por

triplicado. Para el banco transferir 2 ml de agua destilada a tubos de prueba por triplicado.

La reacción colorimétrica se hace agregando 1 ml de reactivo colorido de ninhidrina a cada tubo de prueba, tapar todos los tubos y calentarlos por 16 minutos en un baño de agua en ebullición. Enfriar por 20 min en baño de agua a 20 °C.

Por último se hace la medición en el espectrofotómetro, agregando a cada tubo 5 ml de solución de dilución, mezclar el contenido de cada tubo y medir la absorbancia a 570 nm contra agua destilada, durante los siguientes 30 min después de la adición de la solución de dilución.

Cálculos:

Promediar las lecturas de absorbancia obtenidas por triplicado de cada muestra, restar la absorbancia promedio del blanco de las muestras y del estándar de glicina. Las concentraciones de amino nitrógeno libre de las muestras se calcula:

$$\text{FAN (mg/L)} = (\text{abs neta solución prueba} / \text{abs neta solución glicina}) \times 2 \times \text{dilución}$$

APENDICE C

Aminoácidos Libres

Reactivos:

- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua grado HPLC
- AccQ. Fluor Reagent kit (buffer de boratos, derivatizante en polvo y solución para dilución del derivatizante)
- Eluyente A Waters AccQ. Tag
- Hidrolizado estándar Waters

Materiales y equipo:

Cromatógrafo de líquidos marca Hewlett Packard modelo 1100 con automuestreador y detector de UV- fluorescencia.

Columna Waters AccQ. Tag High Efficiency Nova Pak C₁₈ 4 µm

Heating block 55°C

Tubos de reacción

Pipetas Pasteur

Insertos

Viales con septa de silicón

Procedimiento:

Para la preparación de la muestra, tomar 400 µl de mosto y añadir 800 µl de acetonitrilo, agitar y centrifugar, del sobrenadante tomar 10 µl para realizar la reacción de derivatización

Reconstrucción del reactivo derivatizante, golpeando suavemente el reactivo AccQ fluor para bajar el polvo de las paredes del vial (2A), transferir 1 ml del reactivo de dilución (2B) al vial 2ª, tapar ajustando la tapa y dar vortex por 10 s, calentar el vial en la parte superior del heating block para disolver el reactivo por no más de 10 min.

Reacción de derivatización, en un tubo de reacción agregar 10 µl de muestra y 70 µl de buffer de borato y aplicar vortex, posteriormente adicionar 20 µl de reactivo

AccQ fluor, aplicar vortex y dejar reposar un minuto. Transferir el contenido del tubo de reacción con una pipeta pasteur a un vial con inserto de bajo volumen, tapar con septa de silicón y una vez cubierto el vial, calentar 10 min en el heating block a 55°C.

Para la separación se utilizó un cromatógrafo con detector de UV y Fluorescencia con un sistema de gradiente de una bomba utilizando 3 eluentes: buffer de fosfato y acetato (AccQ Tag eluente A), acetonitrilo y agua grado HPLC, a un flujo de 1 ml/min. usando los gradientes de la tabla. Por último ajustar la temperatura de columna a 37°C y programar el detector a una longitud de onda de excitación de 250 nm y longitud de onda de emisión de 395 nm.

Injectar 10 0 20 µl del derivado e interpolar la señal obtenida en la curva de calibración. Se realizaron los cálculos tomando en cuenta el tratamiento y la cantidad de derivado inyectado.

Tabla Gradiente para separación de aminoácidos para Waters AccQ Tag. A: eluente A AccQ Tag, B: Acetonitrilo grado HPLC, y C: agua grado HPLC

Tiempo (min)	% A	% B	% C
inicial	100	0	0
0.5	99	1	0
18	95	5	0
19	91	9	0
29.5	83	17	0
33	0	60	40
36	100	0	0

APENDICE D

Análisis de Carbohidratos

Reactivos:

- Agua grado HPLC filtrada
- Benzoato de sodio 0.1 % como conservador. Disolver 0.200 g de benzoato de sodio con agua grado HPLC aforado a 200 ml
- Glucosa 99.9 % de pureza
- Maltosa 99 % de pureza
- Maltotriosa hidratada
- Fructosa grado reactivo o equivalente
- Manitol (estándar interno)

Materiales y equipo:

- Columna U-Spherogel Carbohydrate 6.5 mm x 30 cm Beckman
- Cromatografo de líquidos marca HP modelo 1100 con detector de índice de refracción y automuestreador
- Membranas de 0.45 µm millipore
- Cartuchos Sep Pack C₁₈, waters associates
- Papel filtro Reeve Angel # 202

Procedimiento:

Primeramente se prepara el stock de azúcares pesando 0.5 g de cada azúcar y añadir en un matraz volumétrico de 25 ml, aforar con solución de benzoato de sodio 0.1 %. Para el caso de maltotriosa colocar 0.1 g en un matraz volumétrico de 5 ml y aforar con benzoato de sodio 0.1 %.

El estándar de azúcares se prepara colocando 1 ml de agua grado HPLC filtrada en un matraz volumétrico de 5 ml y añadir las siguientes cantidades de soluciones stock de azúcares: 500 µl de maltotriosa, 350 µl de maltosa, 30 µl glucosa, 40 µl de fructosa y 360 µl de manitol. Se afora con agua grado HPLC.

Preparación de la muestra, filtrar el mosto con papel filtro Reeve Angel, colocar 1 ml del mosto filtrado en un matraz volumétrico de 5 ml y añadir 360 µl de manitol siendo el estándar interno y aforar con agua grado HPLC, pasar la muestra a través de un filtro con membrana 0.45 µm y cartucho sep pack C₁₈. El filtrado se cubre de la luz y se coloca en viales de 2 ml.

El HPLC tiene que estar bajo ciertas condiciones las cuales son: temperatura de columna de 90°C, agua grado HPLC filtrada como eluente, velocidad de flujo 0.6 ml/min y volumen de inyección de 20 µl

Cálculos:

La concentración de cada azúcar se calcula de la siguiente manera:

$$\text{G de azúcar} / 100 \text{ ml de mosto} = \text{área del azúcar} / \text{respuesta del azúcar}$$

APENDICE E

Medición de Diacetilo

Reactivos: Preparar solución stock de 2,3 Hexanediona disolviendo 250 mg en agua en un total de 50 ml, este reactivo es estable máximo 2 meses en refrigeración. Para preparar una solución de trabajo se diluye 1 ml en 100 ml de agua.

- Para la solución de diacetilo se disuelve 250 mg en agua en un total de 50 ml, y se toma 1 ml de esta solución en 100 ml de agua para tener la solución de trabajo.
- 2,3 pentanodiona se prepara de la misma forma que las dos soluciones anteriores.

Materiales: Baño de agua a 60°C; Horno a 45°C; Papel filtro Reeve Angel 202; Jeringas; Viales; Cromatógrafo de gases marca Shimadzu modelo GC-17^a con headspace y detector de captura de electrones; Columna HP 5 30 mm x 0.25 mm marca Agilent

Procedimiento: Primeramente se prepara la muestra, enfriándola entre 0-10°C, descarboxilarla con agitación suave en un vaso de precipitado y filtrar con papel filtro Reeve Angel. El cromatógrafo tiene que estar bajo ciertas condiciones las cuales son: temperatura del inyector y detector a 150°C, columna a 45°C, flujo de gases acarreador a un flujo de 1 ml/ min. Se realiza una calibración siguiendo la curva de la tabla:

Tabla 1. Soluciones de calibración para los diferentes niveles de concentración de la curva de calibración.

Nivel	µl de sol'n de diacetilo	µl de sol'n de 2,3 pentanodiona
1	10	10
2	12	25
3	50	50
4	100	100
5	150	150
6	200	200
7	400	400
8	600	600

Cálculos:

El factor de respuesta es calculado de los coeficientes de regresión lineal graficando los µg/L de los compuestos añadidos en el eje de las abscisas contra la relación del área compuesto / área del estándar interno en eje de las ordenadas. El inverso de la pendiente de la curva de calibración será el factor de respuesta usado para calcular la cantidad de cada compuesto en la muestra.

APENDICE F

Extracción de ARN para análisis de microarreglos por el método establecido por Schmith y colaboradores (1992).

Reactivos: Buffer AE: Pesar 50 mM de acetato de sodio y 10 mM EDTA a un pH de 5.3; Fenol SDS al 10 %; Fenol: cloroformo (1:1); Acetato de sodio: pesar 3M de acetato de sodio y ajustarlo a un pH de 5.3; Etanol absoluto; Etanol al 80 %; Agua libre de nucleasas; Dnasa I (marca roche): se resuspende el liofilizado en 5.5 ml de agua libre de nucleasas; Buffer de incubación de Dnasa I (marca roche): [1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl and 10 mM MnCl₂, pH 7.0 (25°C)]

Materiales y equipos: Centrifuga refrigerada; Tubos eppendorf de 1.5 ml; Plancha de calentamiento; Hielera con hielo seco; Micropipetas: p20, p200 y p1000.

Procedimiento: Colectar levadura del fermento tomando 1.5 ml en tubos de la marca eppendorf de 1.5ml, centrifugar a 14,000 rpm por 3 min a 4°C con el fin de formar un pellet. Posteriormente resuspender el pellet en 400 µl de buffer AE, añadir 40µl de SDS al 10 % y agregar 500 µl de fenol equilibrado, dar vortex y transferirlo a una plancha de calentamiento a 65°C por 8 min, invirtiendo el tubo cada minuto.

Transcurrido el tiempo, poner en hielera con hielo seco por 30 min para formar cristales de fenol, posteriormente se centrifuga 2 min a máxima velocidad.

Transferir fase acuosa a un tubo nuevo y agregar igual volumen de fenol:cloroformo (1:1), mezclar por 3 min y centrifugar 2 min a máxima velocidad. Remover la fase acuosa y agregar 40 µl de acetato de sodio, mezclar por inversión y agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto y dejarlo a temperaturas de -70 °C por un tiempo de 4 h aprox. para favorecer la formación del pellet. Posteriormente centrifugar 20 min a 10000 rpm, se remueve el alcohol con micropipeta y se agrega 300 µl de etanol al 80%, invertir el tubo dos ocasiones y centrifugar 2 min a 14,000 rpm. Se remueve el etanol y se deja secar cuidando de que no se deshidrate por completo, y transcurrido esto se agrega 20 µl de agua libre de nucleasas.

Se agrego Dnasa I (agregando 10 µl de enzima y 90 µl de buffer, se dejo incubando por 15 min a temperatura ambiente. Por último se precipito el ARN con 40 µl de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto con el fin de trasladarlo al Instituto de Fisiología de la UNAM (Universidad Autónoma de México).

APENDICE G

Elaboración de Microarreglos

Reactivos:

- Kit de Promega Z3604
- RNAsa H y solución buffer para esta enzima.
- Kit Promega Z3613
- Acetato de sodio 3M
- Solución Binding
- Etanol 80%
- Agua desionizada
- Bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9.0)
- DMSO
- Kit de Promega Z3613
- SDS al 1%
- Solución de prehibridación SSC 5X, SDS al 0.1%, BSA al 1%
- Solución de hibridación UniHyb (Array It)
- Soluciones de lavado: SSC1X-SDS al 0.05%; SSC 0.06%

Materiales y Equipo:

- Planchas de calentamiento
- Vortex
- Centrifuga
- Laminilla para microarreglo
- Cubreobjetos HybriSplit Schleicher & Schuell
- Cámara de hibridación Corning 2551
- Speed-vac Savant
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Hielera con hielo
- Lámpara de luz UV (0.12 J x cm²)
- Escáner ScanArray 4000 marca Packard Biochips, Billerica MA, USA)

Procedimiento:

Síntesis y marcaje del ADNc adaptador aminoalilo.

La mezcla de reacción para el marcaje se muestra en la **tabla**, para el ARN extraído de las muestras control y de prueba. La reacción se incubó a 70°C por 10 min, posteriormente es

colocado en hielo por 5 min y mezclar las reacciones A y B por separado para el estado control y de prueba. Centrifugar e incubar por 10 min a 25°C, posteriormente a 42°C por 2 horas.

Tabla. Mezcla A: Reacción para síntesis de ADNc para microarreglos

Componente	µl de reacción
ARN total	2.0
Oligo (dt)	1.0
Random primers	1.0
Agua	1.0
Total	20.0

Nota: el ARN de las muestras control y de prueba, la mezcla se realiza por separado.

Tabla. Mezcla B: Reacción para síntesis de ADNc para microarreglos

Componente	µl de reacción
Buffer ChipShot RT 5X	8.0
MgCl ₂ (25mM)	4.8
Aminoalil-NTP mix	4.0
Transcriptasa reversa	3.2
Total	20.0

Siguiendo con el protocolo se realiza un tratamiento con RNAsa H para eliminar el ARN y dejar solamente ADNc, agregando 1.0 µl y 0.35 µl de la solución buffer a los 40 µl totales de reacción, se mezcla suavemente e incubar a 37°C por 5 min.

Purificación del aminoalil ADNc usando el kit de Promega 23613.

Agregar 4 µl de acetato de sodio 3M y 225 µl de solución binding a los 40 µl de aminoalil-ADNc, vortex por 5 a 10 s, posteriormente aplicar la mezcla a la columna y dejar reposar por 5 min. Centrifugar a 14000 rpm por 1min. Lavar con 500 µl de etanol al 80% y centrifugar a 14000 rpm por 1 min, esto por tres veces. Se centrifuga para remover completamente el exceso de etanol. En un tubo nuevo se eluye dos veces con 30 µl de agua desionizada y se deja secar en el Speed vac savant. Ya seco se agrega 4.5 µl de bicarbonato de sodio 100mM (pH9.0) para resuspenderlo.

Reacción de conjugación.

Disolver el colorante con 4.5 µl de DMSO dando vortex por 10 s, mezclar con los 4.5 µl de aminoalil-ADNc purificado y resuspender en vortex. Incubar a temperatura ambiente durante 60 min protegiendo la reacción de la luz. Transcurrido el tiempo se agrega 72 µl de agua.

Purificación del aminoalil-ADNc marcado por medio del kit de Promega Z2613.

Agregar 8 µl de acetato de sodio y 440 µl de solución binding, mezclar suavemente y aplicar a la columna. Se deja 5 min reposando y se centrifuga 1 min. Posteriormente se lava con 500 µl de etanol al 80% y se centrifuga 1 min, realizando este pasó tres veces. Después centrifugar 1 min para eliminar trazas de etanol y en un tubo limpio se eluye con 50 µl de agua desionizada.

Pretratamiento del microarreglo

La laminilla se prehidrata exponiendo el lado impreso a vapor a 50°C durante 10 s, se voltea para secar y se vuelve a exponer al vapor, esto se realiza tres veces. Para fijarlo se irradia con dos ciclos de luz UV. Lavar con SDS 0.1% durante 1 min a temperatura ambiente. Lavar 2 veces con agua desionizada durante 1 min y pasar a solución de prehibridación (SSC 5 X, SDS al 0.1%, BSA al 1%), se incubó en agitación suave por una hora a 42°C. Posteriormente se lavó 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se deja secar por centrifugación a 1500 rpm por 5 min.

Hibridación del microarreglo

Tomar volumen suficiente para tener .1 unidades de D.O. de muestra marcada con Cy3 y Cy5 por separado. Secar por completo en el Speed vac savant y resuspender ambas sondas con 3.5 µl de agua desionizada estéril y 14 µl de solución de hibridación UniHyb (Array It), preincubar por 65°C. Ambas soluciones se mezclan dando un volumen final de 35 µl. La mezcla se desnaturaliza a 94°C por 5 min, después a 65°C por 30s.

Transcurrido el tiempo se desliza suavemente la mezcla sobre el área del microarreglo y se cubre la superficie con un cubreobjetos (HybriSplit Schleicher & Schuell). Después se coloca la laminilla en la cámara de hibridación (Corning 255), incubando 12h a 42°C.

Lavado de los microarreglos hibridados de la siguiente manera:

- 2 min con 50 ml de SSC1X-SDS al 0.05%
- 2 min con 50 ml de SSC 0.06%
- Dos lavados de 2 min con 50 ml de SSC 0.06%

Al termino de los lavados, las la minillas se secan por centrifugación a 1500 rpm por 5 min.

Análisis de microarreglos

Los microarreglos se leen en el escáner Scan Array 4000 (Packard Biochips, Billerica MA, USA). Las imágenes obtenidas en formato tiff de 16 bits se analizan por medio del programa SpotFinder (<http://www.tm4.org/spotfinder.html>), transformando en valores de

intensidad relativa de fluorescencia, tomando en cuenta el background y offset de cada spot. El archivo se guarda como “.txt”.

Los datos se suben al programa GeneArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>) y se convierten a base logarítmica. Este programa realiza por medio de la plataforma “R” transformaciones en los datos como son: corrección de fondo, normalización, filtrado de intensidades, análisis de réplicas swap. Usa logaritmos base 2 para R por lo que la razón de expresión está dada por unidades de cambio es de magnitud 2, esto es, la razón logarítmica es representada por el valor $R = \log_2(\text{intensidad Cy5}) - \log_2(\text{intensidad Cy3})$ y la intensidad global por el valor $I = \log_{10}(\text{intensidad Cy5}) + \log_{10}(\text{intensidad Cy3})$.

Una vez teniendo los datos R e I, el programa identifica los genes que muestran ser diferencialmente expresados. Esto se lleva por medio del valor Zscore tomando la siguiente fórmula:

$$Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{SD}(R)$$

En donde:

Z_i = Z score para cada spot

R_i = razón logarítmica de cada elemento

$\text{SD}(R)$ es la desviación estándar de R

Con esta fórmula los elementos del arreglo son codificados por color siguiendo los parámetros de:

- Menos de una desviación estándar de la media es de color verde
- Entre 1 y 1.5 desviaciones estándar es azul
- Entre 1.5 y 2 desviaciones estándar. color celeste
- Mas d 1.5 desviaciones estándar, color amarillo
- Más de 2 desviaciones estándar, color blanco

Entre más se alejen los valores Zscore de la media muestran son significativamente expresados de forma diferencial (Gómez Mayén et al., 2006). Los signos del z score negativos y positivos indican los niveles ya sea reprimidos o inducidos de los transcritos. Se toma uno de los parámetros de arriba según el criterio a elegir y se pasan los grupos de genes identificados con cambio significativo de expresión al programa Babelomics 4 (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es>) junto con el programa Kegg2 (<http://www.genome.jp>), con el fin de identificar los procesos biológicos en los que se involucran los genes identificados.

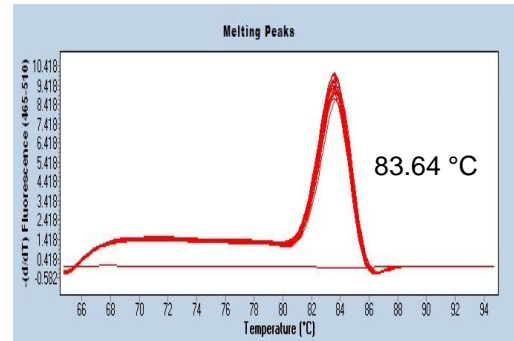
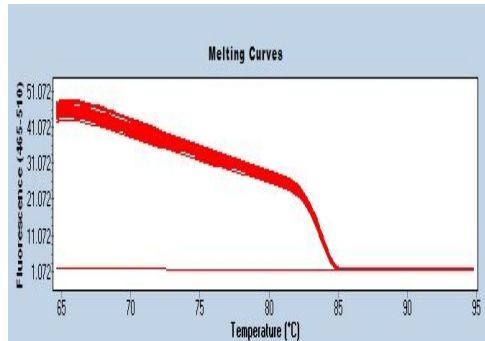
APENDICE H

Curvas de disociación de los amplicones

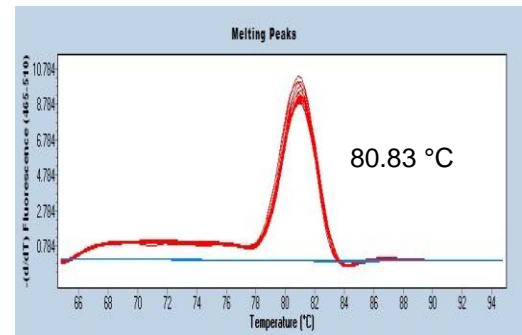
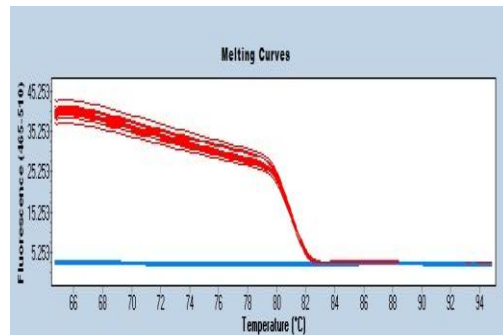
Curva de disociación

Pico Melting

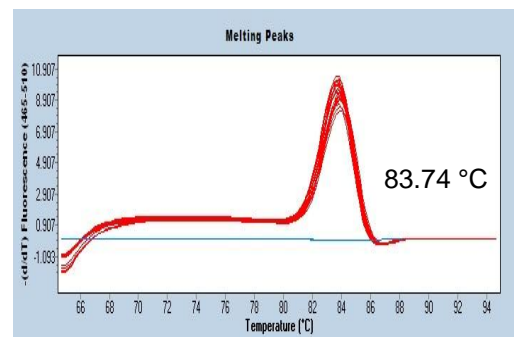
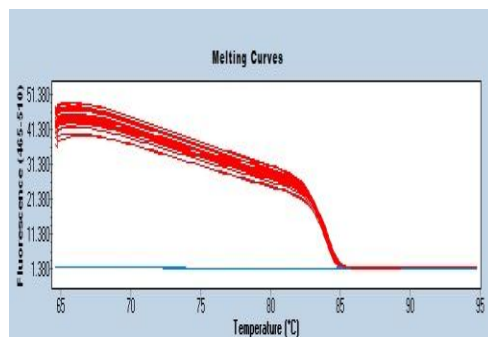
MET3



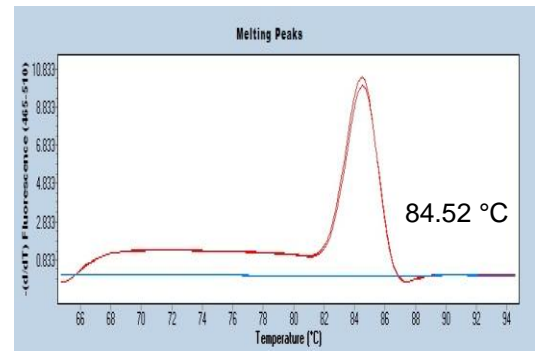
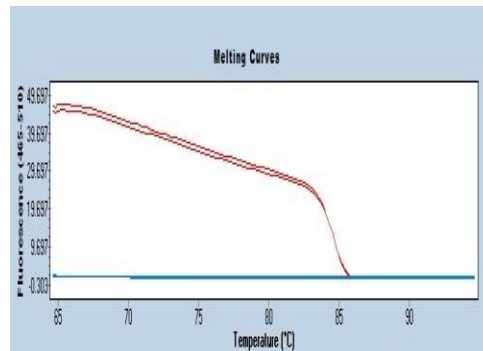
MET4



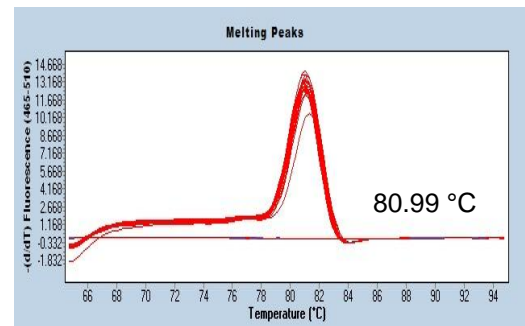
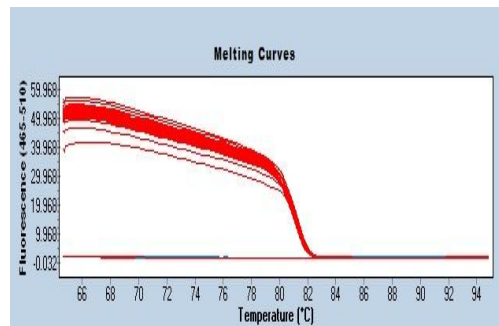
CBF1



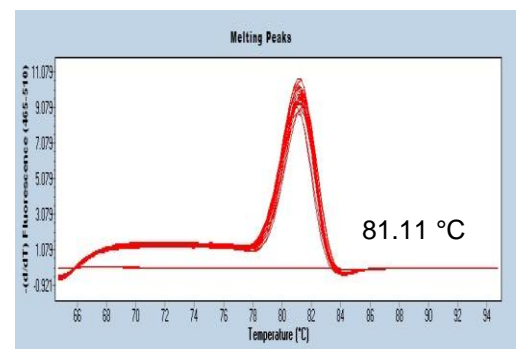
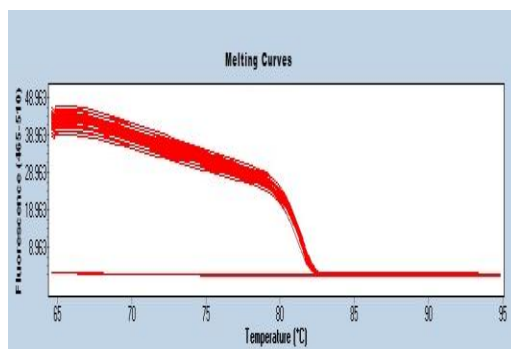
MET28



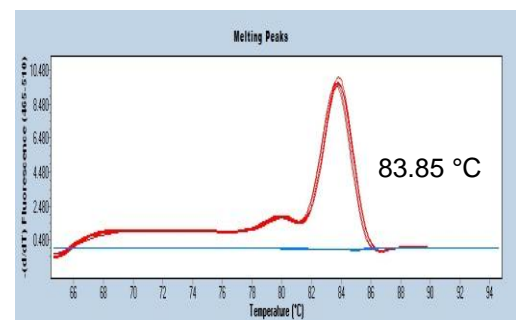
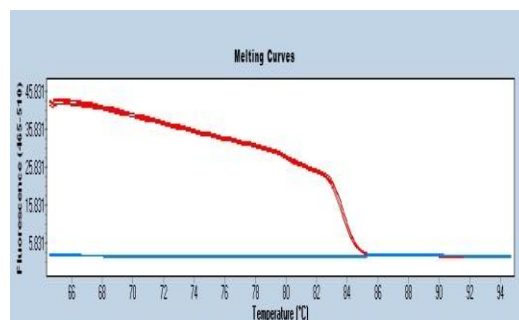
MET32



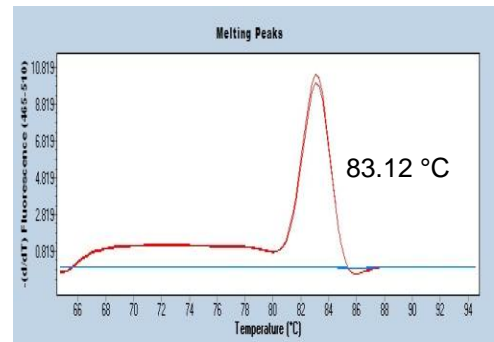
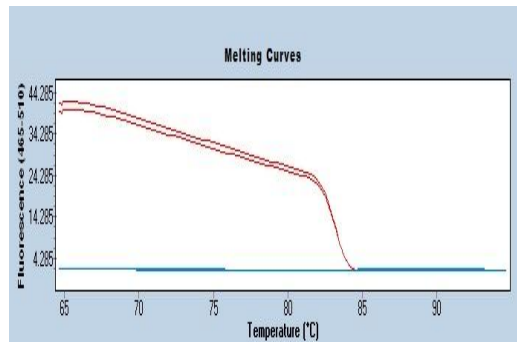
MET25



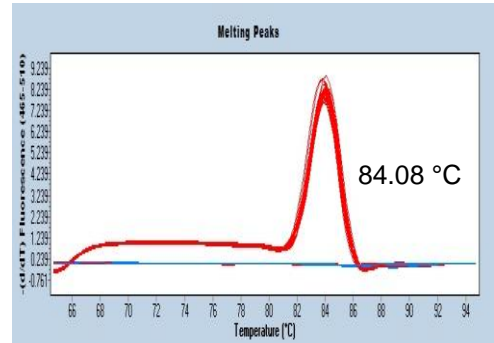
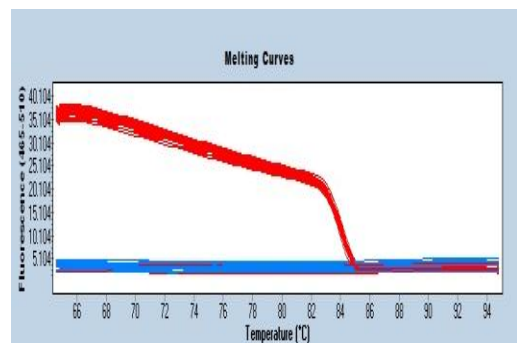
MET31



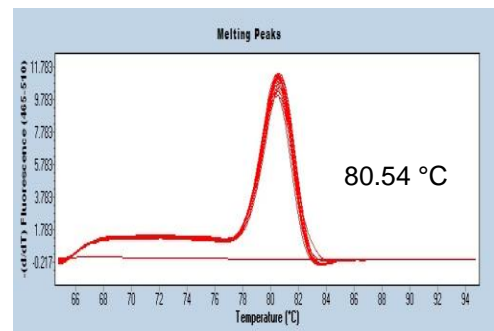
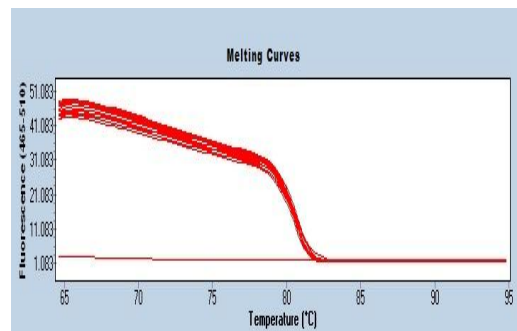
MET2



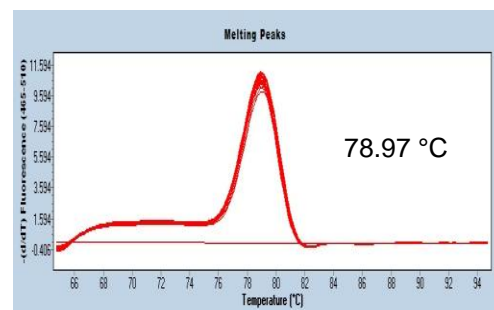
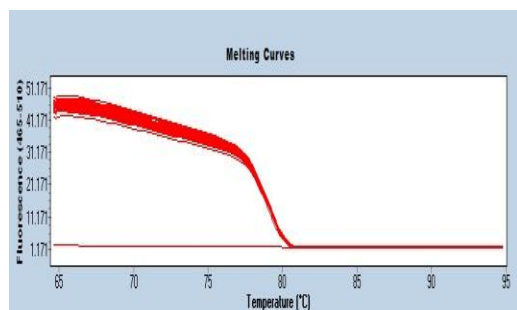
MET13



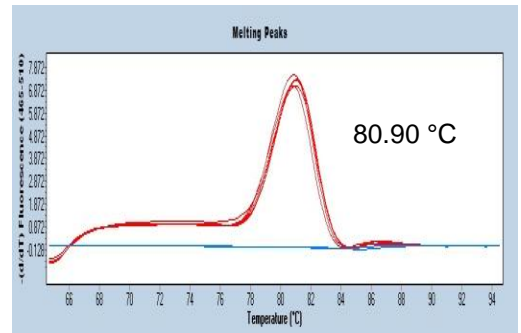
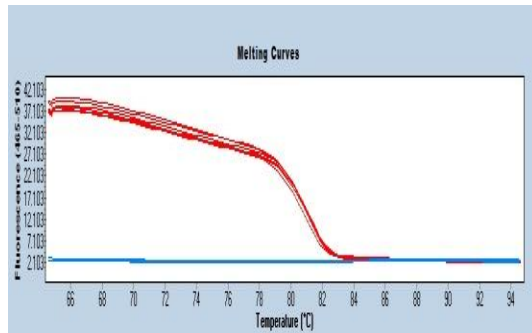
MET6



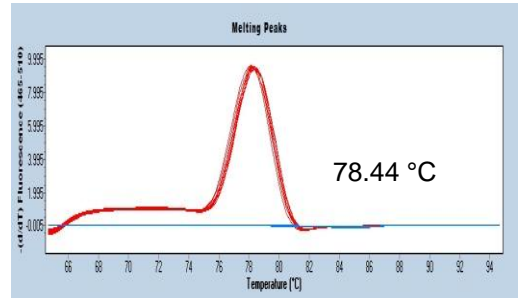
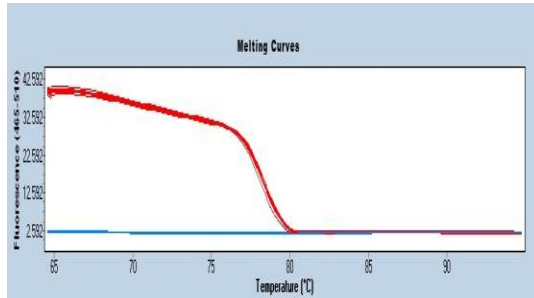
MHT1



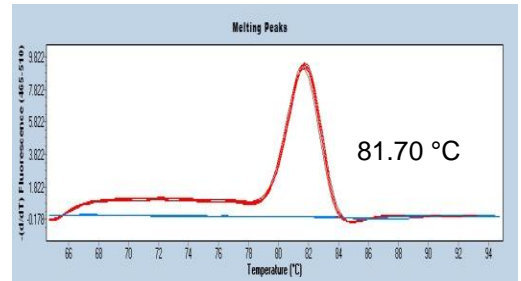
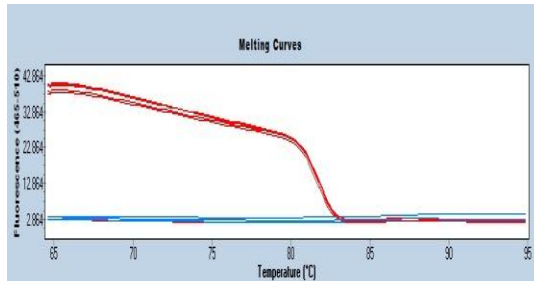
HOM6



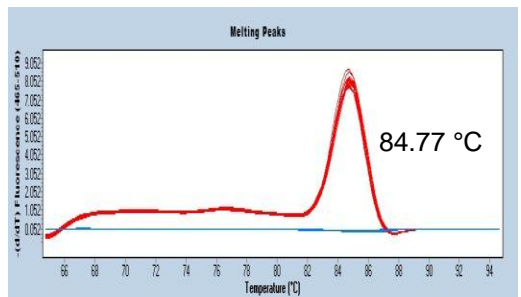
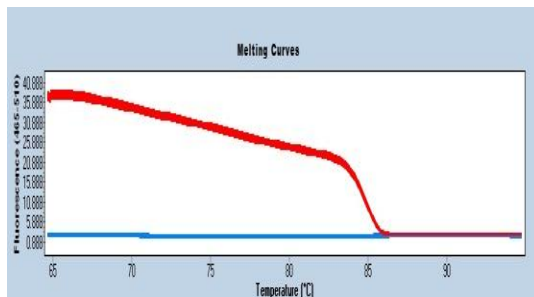
HOM3



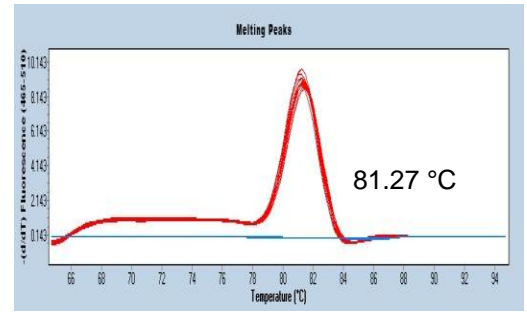
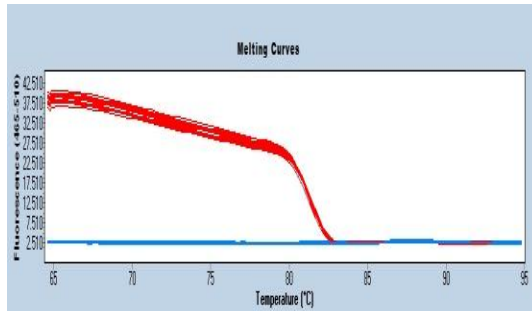
HOM2



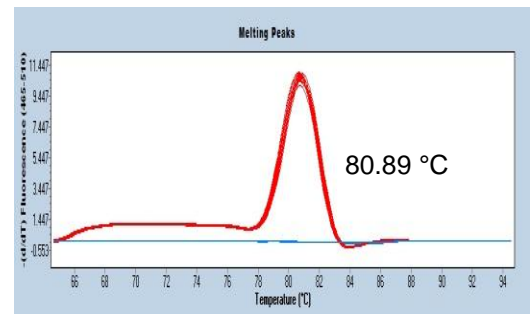
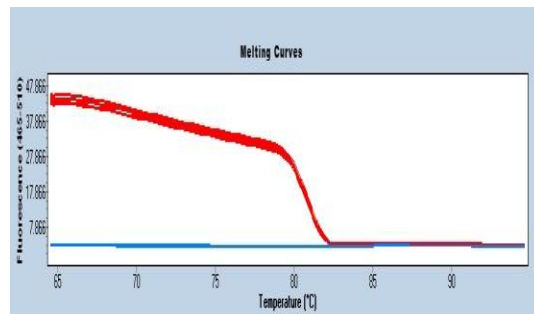
CYS3



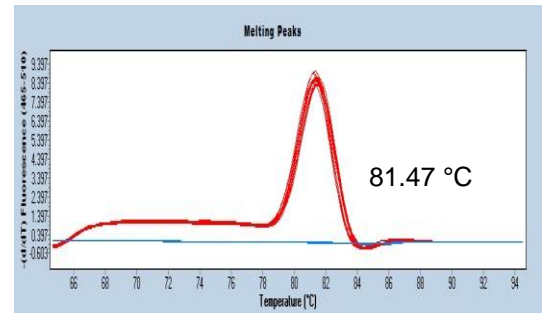
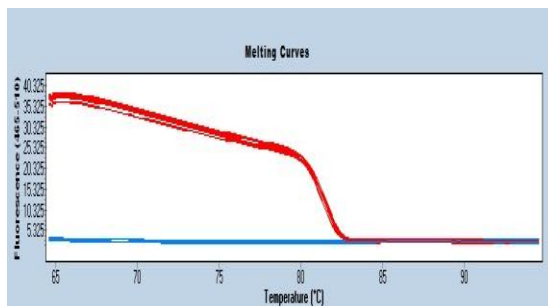
CYS4



SER2



ACT1



LITERATURA CITADA

1. Barker M. G. and Katherine A. Smart. 1996. Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain. J. Am. Soc. Brew. Chem **54**:121-126.
2. Bamforth C. 2003. Wort Composition and Beer Quality. En K. Smart (Ed). Brewing yeast fermentation performance. Segunda Ed. págs. 77-84. Oxford, UK: Blackwell Publishing
3. Blaiseau P-L, A-D. Isnard, Y. Surdin-kerjan, and D. Thomas. 1997. Met31p and Met32p, two related zinc finger proteins, are involved in transcriptional regulation of yeast sulfur amino acid metabolism. Mol. Cell. Biol. **17**: 3640–3648
4. Blaiseau P-L. and D. Thomas. 1998. Multiple transcriptional activation complexes tether the yeast activator Met4 to DNA. EMBO J. **17**: 6327–6336
5. Boulton C. y Quain D. 2003. Brewing yeast and fermentation. Primera Ed. pp: 69-142. Oxford, UK: Blackwell Publishing
6. Casey G. 2007. Supply chain lesson in improved process control for product quality attributes and plant productivity metrics as captured in fishbone diagrams. En P. W. Gales (Ed). Brewing Chemistry and Technology. USA págs. Am. Soc. Brew. Chem. pp:181-183
7. Chan S. Y. and D. R. Appling. 2003. Regulation of S-Adenosylmethionine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **278**: 43051–4305
8. Cañamar C. 2007. Impacto del contenido de alfa amino nitrógeno en el mosto para producir cerveza, sobre la síntesis de dicetonas vecinales y alcohol isoamílico en una fermentación utilizando levadura *Saccharomyces uvarum*. San Nicolás de los Garza, N.L., México: Universidad Autónoma de Nuevo León.

9. Duan, W., F. A. Roddick, V. J. Higgins, and P. J. Rogers. 2004. A parallel analysis of H₂S and SO₂ formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **62**: 35-41

10. Eßlinger H. M. 2009. Handbook of Brewing. WILEY-VCH. Alemania.

11. Fu W., J. Hu, T. Spencer, R. Carroll, G. Wu. 2006. Statistical models in assessing fold change of gene expression in real-time RT-PCR experiments. *Computational Biology and Chemistry*. 30: 21–26
 Glatthar J., J. Heinisch, and T. Senn. 2002. A study on the suitability of unmalted triticale as a brewing adjunct. *Am. Soc. Brew. Chem.* **60**:181-187.

12. Goldammer, T. 2008. The Brewers' Handbook. Segunda edición. Apex Publishers. USA, pp. 68.

13. Global Gene Hunter. Web Primer [internet] Standford University. Disponible en el sitio de red: <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/geneHunter> [última actualización en noviembre de 2010].

14. Gómez M., G. Corral Guillé, L. Riego Ruiz y G. Coello Coutiño. 2006. The GenArise Package. Instituto de Fisiología Celular UNAM. México DF. pp: 1-27

15. Grant H. L. 1995. Lúpulo. Capítulo 9 en: Handbook of Brewing. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp. 157.

16. Hanser J., M.C. Kielland-Brandt. 1996. Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases sulfite in beer. *J. Biotechnol.* **50**:75- 87.

17. Hardwik W. 1995. Las propiedades de la cerveza. Capítulo 19 en: Handbook of Brewing. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp. 587

18. Heggart, H.M., A. Margaritis, H. Pikington, R.J. Stewart, T.M. Dowhanick e I. Russell. 1999. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *MBAA Tec. Quart.* **36**:383-406.

19. Hinnebusch A. G. and K. Natarajan. 2002. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. 2002. *Eukaryotic Cell*. **1**:22–32
20. Hiraishi Hiroyuki, Tsuyoshi Miyake and Bun-ichiro Ono. 2008. Transcriptional regulation of *Saccharomyces cerevisiae* CYS3 encoding cystathionine γ -lyase. *Curr Genet*. **53**:225–234
21. Hough S. J., E. D. Briggs, R. Stevens, W. T. Young. 1982. *Malting and brewing science: Volumen II Hopped Wort and Beer*, P. 527-565, Segunda Edición, Chapman & Hall, USA
22. Kendall N. T. 1995. Cebada y Malta. Capitulo 6 en: *Handbook of Brewing*. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp. 115.
23. Klimovitz Ray. 2002. *Manual del cervecero en la práctica*. Asociación de Maestros Cerveceros de las Americas. USA.
24. Knudsen F. B. 1984. Fermentation variables and their control. *Fermentation Symposium—Part II*.
25. Kunze W. 1999. *Technology Brewing and Malting*. Segunda Ed. Berlin, Germany: VLB.
26. Laundaud, S., Helink S and Bonnarme, P. 2008. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **77**: 1191-1205..
27. Lewis M. and T. Young. 1995. *Brewing*. London, UK: Chapman & Hall.
28. Lekkas C., G. Steward, A. Hill, B. Taidi, and J. Hudgson. 2005. The importance of free amino nitrogen in wort and beer. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am*. **42**:113-116

29. Lekkas C., G. Stewart, A. Hill, B. Taidi, and J. Hodgson. 2007. Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. *J. Inst. Brew.* **113**:3-8.
30. Linderholm A. L., L. Carrie, G. Kumar, Y. Hong, and L. F. Bisson. 2008. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1418–1427.
31. McKee T. 2003. Bioquímica la base molecular de la vida. Tercera edición. McGraw Hill Interamericana. Madrid
32. Meilgaard, M. C. 1976. Wort composition: with special reference to the use of adjuncts. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **13**:78-90.
33. Meilgaard M. 1999. Wort Composition. En J. McCabe (Ed), *The Practical Brewer. Tercera Ed.* pp: 147-163. Wauwatosa, WI: Master Brewers Association of the Americas
34. Miracle R., S. Ebeler, and C. Bamforth. 2005. The measurement of sulfur-containing aroma compounds in samples from production-scale brewery operations. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **63**:129-134.
35. Moll M. M. 1995. Agua. Capítulo 8 en: *Handbook of Brewing*. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp. 133.
36. Munroe J. M. 1995 a). Aging & finishing. Capítulo 10 en: *Handbook of Brewing*. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp. 358
37. Munroe J. H. 1995 b). Fermentación. Capítulo 13 en: *Handbook of Brewing*. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp. 323.
38. Munroe J. H. 2006. En: *Handbook of Brewing. Aging and finishing. Capítulo 13.* 2 edición. Priest F. G., Stewart G. G. (editors). Taylor and Francis group, USA, pp. 531.

39. Perpète P., O. Duthoit, S. De Maeyer, L. Imray, A. Lawton, and K. Stavropoulos. 2006. Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Yeast Res. **6**:48-56.
40. Pérez E. 2010. Evaluación analítica y sensorial del efecto de variables de proceso (cepa, mosto y viabilidad de levadura) en la generación de compuestos de azufre en la producción de cerveza. Monterrey, Nuevo León, México: Instituto Tecnológico y de Estudios superiores de Monterrey
41. Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. **29**:45.
42. Pickerell A., A. Hwang, and C. Axcell. 1991. Impact of yeast-handling procedures on beer flavor development during fermentation. J. Am. Soc. Brew. Chem. **49**:87.
43. Priest F. G. and I. Campbell. 1987. *Brewing Microbiology*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Great Britain, Cambridge, pp. 39-44.
44. Russell I. 1995. Levadura. Capítulo 10 en: Handbook of Brewing. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp.169
45. Scmitt M., A. T. Brown, and L. B. Trumpower. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. **18**:3091-3092
46. Shan X., L. Wang, R. Hoffmaster, and W. D. Kruger. 1999. Functional characterization of human methylenetetrahydrofolate reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **274**:32613–32618
47. Stewart G. G. 1995. Adjuntos. Capítulo 7 en: Handbook of Brewing. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, pp. 121.

48. Thomas D., and Y. Surdin-Kerjan. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**:503–532
49. Thomas D., A. Becker, and Y. Surdin-Kerjan. 2000. Reverse methionine biosynthesis from S-Adenosylmethionine in eukaryotic cells. 2000. J. Biol. Chem. **275**: 40718–40724
50. Tsoi Bonny M., A. G. Beckhouse, C. L. Gelling§, Mark J. Raftery, J. Chiu, A.M. Tsoi, L. Lauterbach, P. J. Rogers, V. J. Higgins, and I. W. Dawes. 2009. Essential role of one-carbon metabolism and gcn4p and bas1p transcriptional regulators during adaptation to anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **284**:11205–11215
51. Ullrich T.C., M. Blaesche, and R. Huber. 2001. Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. EMBO J. **20**:316-329.
52. Vermeulen C., I. Leuque, T.H. Tran, and S. Collins. 2006. Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. J. Agric. Food Chem. **54**:5061-5068
53. Wieland G, P. Hemmerich, M. Koch, T. Stoyan, J. Hegemann, S. Diekmann. 2001. Determination of the binding constants of the centromere protein Cbf1 to all 16 centromere DNAs of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. **29**:1054-60
54. Wilson E., and J.P. Kraus. 2004. Cystathionine γ -Synthase: Structure, function, regulation, and location of homocystinuria causing mutations. J. Biol. Chem. **279**: 29871–29874
55. Yoshida S., J. Imoto, T. Minato, R. Oouchi, M. Sugihara, T. Imai, T. Ishiguro, S. Mizutani, M. Tomita, T. Soga, and H. Yoshimoto. 2008. Development of bottom-fermenting *Saccharomyces* strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. Appl. Environ. Microbiol. **74**:2787–2796

56. Zheng X., T. D' Amore, and G.G. Stewart. 1994. Factors influencing maltotriosa utilization during wort fermentation. *J. Am. Brew. Chem.* **52**:41-47

RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Clara Susana Leal Guerra

Candidato para el Grado de

Maestría en ciencias con acentuación en Microbiología

Tesis: Regulación de la expresión de genes involucrados en la producción de compuestos de azufre en *Saccharomyces cerevisiae*.

Campo de estudio: Microbiología Industrial

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 7 de diciembre de 1983, hija de Raúl Leal Beltrán y Ma. Concepción Guerra Treviño.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2008

Experiencia Profesional: Practicante en el área de Análisis sensorial. Departamento de aseguramiento de calidad, de julio a diciembre de 2004. Practicante en el área de Microbiología de Oficina de Servicios en el departamento de investigación y desarrollo, de enero 2005 a enero 2006.

Biosynthesis of amino acids sulfur in *Saccharomyces cerevisiae* is affected by fermentation conditions in beer production

C. S. Leal-Guerra¹, E. Pérez-Ortega², L. Damas-Buenrostro², J. C. Cabada²,

L. Galán-Wong¹ and B. Pereyra-Alfárez^{1*}

¹ Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, NL. 66450. México

² Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma. Av. Alfonso Reyes 2202 Norte. Col. Bellavista, Monterrey, N.L. 64442 México

* For correspondence: bpereyra@gmail.com

Beer elaboration process is still considered, at least in part, an art. It is well known that both yeast and wort play an important role in the quality of final product, because several wort-compounds have influence in aroma and taste. In response to wort composition, the metabolic pathways can be modified in the yeast, and final product could result with high concentration of undesirable volatile sulfur compounds (VSC), mainly H₂S and SO₂. In this work we analyzed the expression of genes involved in the biosynthesis of VSC in *Saccharomyces cerevisiae* growing under different fermentation conditions. We designed two kinds of wort: one produced with high content of malt (above 50%) and other with low content of malt (below 50%), and were inoculated with yeast previously maintained at 4°C/4h and 18°C/18h, respectively. Yeast was collected at second day of fermentation and gene expression analysis was done using DNA microarrays. Biosynthesis pathway of sulfur amino acids was affected since the genes MUP3, HOM2, MET2, SER2 and MET3 were up regulated, while genes such as MET13, MET6 and MHT1 were down regulated. Moreover, H₂S production was increased in low malt worts. Our results demonstrate that the wort composition plays an important role in the biosynthesis of sulfur amino acids and it could impact the generation of VSC.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, MET2, MET3, Microarray, VSC

1. Introduction

Beer represents one of the world's oldest and most widely consumed beverages. Its quality is based, mainly, on the wort composition. Wort, which is a liquid obtained from the mashing process of barley and malted barley, is rich in nutrients and sugars that are assimilated by the brewing yeast to produce ethanol. However, yeast can synthesize undesirable compounds too, such as volatile sulfur compounds (VSC) which can affect sensorial quality of the product. Among VSC, sulfur dioxide (SO₂), sulfur hydrogen (H₂S) and dimethyl sulfide (DMS), represent the most important metabolites which concentration and relationship among them must be controlled [3] [4]. Due to its aromatic contribution, the formation of VSC has been subject of interest since it could to play an attractive or repulsive role [6]. On the other hand, it is clear that microelements from the wort, and yeast strain play an important role in both, concentration and type of VSC. Nucleotide and amino acid sequences of some genes involved in the sulfate assimilation (met13, met14, met16, met22, met10, met5, met1, met8), sulfite assimilation (met22, met25, str4, str1), and synthesis of some sulfur amino acids (met6, met7, met13, sam1, sam2) have been characterized, but their genetic expression level and interaction with other genes remains to be documented [8]. Therefore, there is an opportunity to have a greater knowledge on the behavior of genes related to sulfur metabolism under variable conditions of operation. Even more, the characterization of the levels of expression of these genes would help to a great extent to optimize the brewing process. In this paper, we present evidence of the genetic expression of some genes involved in VSC biosynthesis in *S. cerevisiae* growing under different fermentation conditions.

2. Material and Methods

2.1 Strain

The *Saccharomyces cerevisiae* lager strain C820 was provided by Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma. Inoculum cell concentration was adjusted to 1.2×10^6 cells/ml per degree plate. Previous to fermentation, the strain was stored under low (4°C/4 h) or high (18°C/18 h) stress conditions.

2.2 Wort

Based on their malt content, two types of wort were designed: (a) high malt (above 50%); and (b) low malt (below 50%) content. The wort amount was adjusted to 1800 mL. Initial concentration of oxygen was adjusted to 8 ppm by bubbling air to saturation.

2.3 Fermentation and Cell Viability

Fermentation process was done as follow: Wort type (a) was inoculated with strain incubated at 4°C/4 h, while wort (b) was inoculated with cells stored at 18°C/18h. Experiments were carried out by duplicate. All of these fermentations were conducted at 16°C for seven days. The viability was obtained by slide culture according to the method of the ASBC (American Society of Brewing Chemists) [1].

2.4 Microarrays

At second day of fermentation, yeast was harvested, washed with saline buffer and total RNA extracted using the protocol of High Pure RNA™ Isolation kit (Roche Applied Science). Microarrays were performed at Unidad de Microarreglos, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, using the *Saccharomyces cerevisiae* array YOMGW_01. Results were analyzed with GenArise software using a Z score greater than ± 1.5 .

2.5 Measurement of Hydrogen Sulfide

At the end of fermentation, beer samples were collected and this metabolite was evaluated with spectrophotometry technique.

3. Results

3.1 Viability of harvested yeast

The percentage of living cells was more than 90% in the two conditions of fermentation.

3.2 Genetic expression of genes related to biosynthesis of VSC.

In this work we analyzed the expression of genes involved in the biosynthesis of VSC in *Saccharomyces cerevisiae* growing under different fermentation conditions. We designed two kinds of wort: one produced with high content of malt (above 50%) and other with low content of malt (below 50%), and were inoculated with yeast previously maintained at 4° and 18°C, respectively. In order to determine the regulation type, up or down, microarrays results were analyzed with a z-score of ± 1.5 . Our results demonstrated that the regulation of VSC can be divided in two parts: before and after of the homocysteine biosynthesis (Figure 1). Three enzymes located at beginning of biochemical pathway; ATP sulfurilase, aspartic beta-semi aldehyde dehydrogenase, homoserine trans-acetylase and 3-phosphoserine phosphatase, that is MET3, HOM2, MET2 and SER2 genes, respectively, were up-regulated. However, the genes located down of homocysteine, such as the MET13 (coding for a methylenetetrahydrofolate reductase), MET6 (homocysteine methyl-transferase) and MTH1 genes (S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase) were down-regulated. On the other hand, low affinity methionine permease coded by MUP3 it was up regulated.

biosynthesis of homoserine since genes like HOM2 and MET2 which are required for the synthesis of O-acetyl-L-homoserine[8], were up regulated. Nevertheless the key point in the accumulation of H₂S could be caused by the availability of serine in wort and the up regulation of SER2, since this causes an increase in the biosynthesis of cysteine, and subsequently can induce the expression of MET3 which is the first passage in the route of sulfate assimilation. For the S-Adenosil-methionine production, genes MET13 and MET6, which are required for biosynthesis of methionine and AdoMet, were repressed; and the homeostasis between these metabolites was affected since gene MHT1 was down regulated [3]. We suggest that the action exerted in the pathway of serine, methionine and aspartic acid in regulation of certain genes stagnates methionine biosynthesis provoking a sulfide accumulation, leading to an increase in H₂S production.

There is evidence that VSC accumulation can be different among diverse yeast strains, but as a result of this work, we also support the importance of fermentation conditions and wort composition [7].

Acknowledgements This research was support in part by a grant from Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma. CLG is recipient of a fellow from the National Research Council (CONACYT). We thanks to Dr. Jorge Ramirez, from the Instituto de Fisiología Celular, UNAM, for his technical assistance in microarray analysis.

References

- [1] American Society of Brewing Chemists. Report of subcommittee on Microbiology. Journal. 1984; 42: 132
- [2] Garza-Ulloa H., R. Garza Cantu, and A. M. Canales Gaja. Determination of amino acids in wort and beer by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography1. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1986; 44: 47-51.
- [3] Duan, W., F. A. Roddick, V. J. Higgins, and P. J. Rogers. A parallel analysis of H₂S and SO₂ formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2004; 62: 35-41.
- [4] Hardwick W. Marcel Dekker Inc, USA. 1995;587.
- [5] Isnard Anne-Dominique, D. Thomas and Y. Surdin-Kerjan. The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *J Mol Biol.* 1996; 262: 473-84.
- [6] Laundaud, S., Helink S and Bonnarme, P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented foods. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2008; 77: 1191-1205.
- [7] Linderholm, A. L., C. L. Findleton, G. Kumar, Y. Hong, and L. F. Bisson. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74:1418–1427.
- [8] Dominique, T., Y. Surdin-Kerjan. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1997; 503–532.